



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Eduardo Rogério Gonçalves

**Estudo do desenvolvimento da papaína via espectroscopias de
fluorescência e correlação bidimensional no infravermelho**

São José do Rio Preto

2009

Eduardo Rogério Gonçalves

Estudo do desenvolvimento da papaína via espectroscopias de fluorescência e correlação bidimensional no infravermelho

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto-SP.

Orientador: Prof. Dr. Marinômio Lopes Cornelio

São José do Rio Preto

2009

EDUARDO ROGÉRIO GONÇALVES

Estudo do desenvolvimento da papaína via espectroscopias de fluorescência e correlação bidimensional no infravermelho

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto-SP.
Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio**

Aprovado em: 17/ 7 /2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
Orientador
UNESP – São José do Rio Preto

Prof.
Prof.Dr. Marcelo Andres Fossey
UNESP- São José do Rio Preto

Prof.
Hamilton Cabral
USP- Ribeirão Preto

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me iluminou e esteve comigo nos momentos em que mais precisei;

À minha família, meus pais que amo muito e que sempre me ensinaram o caminho correto a trilhar;

Meus irmãos que sempre torceram por meu sucesso, sempre estão ao meu lado, seja nos momentos difíceis ou nas brincadeiras diárias de um para com o outro;

Meus avós, Antonio, Orlando, Geraci e Divina, que me deram os maiores exemplos de sabedoria, que carregarei por toda minha vida;

Ao professor Dr. Marinônio Lopes Cornélio pela orientação e amizade, sendo que seus apontamentos muito contribuíram para minha formação;

Aos amigos que fiz na UNESP nesse período, em especial ao Jorge e a Luciane, com quem convivi diariamente no laboratório. Aos funcionários, Ilva, Paulinho, Barbosa e Marcelino pela amizade e pelas brincadeiras durante esse período;

A todos os amigos e familiares que torcem pelo meu sucesso;

A todos os grandes professores que tive em minha vida, e em especial à minha primeira professora de física, Marilene de Oliveira, que mesmo dentro da difícil realidade de um colégio público, com sua práxis consciente, me encorajou e fez com que despertasse em mim o interesse por essa ciência tão maravilhosa que é a física. Se hoje cheguei aqui ela é “a grande culpada”!, e

A CAPES pelo apoio financeiro.

"Se eu não fosse imperador, desejaria ser professor. Não conheço missão maior e mais nobre que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens do futuro."

D. Pedro II

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo do processo de desenovelamento da papaína via temperatura. Para tanto, foi utilizada a técnica espectroscópica de fluorescência, em conjunto com a espectroscopia de correlação bidimensional, com as análises *sample-sample* e variável-variável aplicadas à região do infravermelho médio. Desta forma, foi possível determinar três temperaturas de pré-transição: 34, 54 e 61°C; sendo que a temperatura de 54°C foi evidenciada tanto por fluorescência quanto pela análise *sample-sample*. Já as temperaturas de 34 e 61°C foram evidenciadas somente na análise *sample-sample*. Além disso, a análise variável-variável descreveu a dinâmica conformacional durante o processo de desenovelamento. Assim, pode-se relacionar a temperatura e a dinâmica conformacional.

Palavras-chave: Papaína. Fluorescência. Desenovelamento. Temperatura. Espectroscopia de correlação bidimensional. Variável-variável; *Sample-sample*.

ABSTRACT

This work presents a study of the unfolding of papain via temperature. In order to do so, the fluorescence spectroscopy technique was used along with two-dimensional correlation spectroscopy by *sample-sample* and variable-variable analyses applied to the medium infrared region. Thus, it was possible to determine the three papain thermal pre-transition temperatures, 34, 54 and 61° C. The 54° C one was obtained by fluorescence spectroscopy and *sample-sample* analyses; whereas the 34 and 61°C, ones, were detected by *sample-sample* alone. Additionally, through variable-variable analysis it was possible to describe the conformational dynamics during the unfolding process. Therefore, the relationship between temperature and conformational dynamics could be matched.

Keywords: Papain. Fluorescence. Unfolding. Temperature. Two dimensional infrared spectroscopy correlation. *Sample-sample*. Variable-variable.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Variação da intensidade de fluorescência com o aumento de Temperatura	48
Figura 2 – Dependência da fração da papaína desenvolvida com aumento de temperatura, utilizando as áreas sob a curva para obtenção da fração desenvolvida	51
Figura 3 - Dependência da fração da papaína desenvolvida com aumento de temperatura, utilizando os valores de intensidade de fluorescência no comprimento de onda de emissão de 348nm	52
Figura 4 - Corte do gráfico sample sample, determinação da principal temperatura de pré-transição através da espectroscopia de correlação.....	54
Figura 5 - Corte do espectro de correlação sample sample e determinação da primeira temperatura de pré-transição da papaína	55
Figura 6 - Corte do espectro de correlação sample sample, nenhuma temperatura de pré- transição evidenciada.....	56
Figura 7 - Corte do espectro de correlação sample-sample e determinação da segunda temperatura de pré-transição da papaína	57
Figura8 - Espectro de correlação síncrona de 25° a 70°C para papaína. As setas indicam os autopicos na linha diagonal e os picos cruzados localizados fora dela	59
Figura 9 – Espectro de correlação 2D-IR assíncrono de 25° a 70°C para a papaína	60

Figura 10 – Espectro de correlação síncrona utilizando intervalo de temperatura de 25° a 43°C. As setas na diagonal principal indicam os autopicos e as setas localizadas fora dela os picos cruzados	61
Figura 11 – Espectro de correlação assíncrona no intervalo de temperatura de 25° a 43°C	62
Figura 12 - Espectro de correlação assíncrona no intervalo de temperatura de 25° a 43°C	64
Figura 13 - Espectro de correlação assíncrona no intervalo de temperatura de 43° a 52°C.....	64
Figura 14 – Espectro de correlação síncrona utilizando intervalo de temperatura de 52° a 70°C	65
Figura 15 – Espectro de correlação assíncrona utilizando intervalo de temperatura que se estende de 52° a 70 °C	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 O ENOVELAMENTO PROTEICO	14
2.1 Modelo de Anfinsen	14
2.2 Modelo de dois estados	15
2.3 Paradoxo de Levinthal	15
2.4 O estado intermediário Molten Globule	16
2.5 Funil de energia e relevos energéticos	17
3 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	19
3.1 Espectroscopia de fluorescência	19
3.1.1 Desativação do estado excitado	21
3.1.2 Relaxação vibracional	21
3.1.3 Conversão Interna	21
3.1.4 Conversão externa	21
3.1.5 Cruzamento intersistema	22
3.1.6 Fluorescência	22
3.1.7 Fluorescências de proteínas	22
3.1.8 Desenovelamento proteico monitorado por espectroscopia de fluorescência .	23
3.1.9 Análise dos dados de equilíbrio conformacional	24
3.2 Espectroscopia de infravermelho.....	25
3.2.1 Tipos de vibrações moleculares	27

3.2.2 Modelo mecânico de uma vibração de estiramento em uma molécula	
diatômica	28
3.2.3 Tratamento quântico das vibrações	30
3.2.4 Regras de seleção	33
3.2.5 Oscilador anarmônico	33
3.2.6 Espectros de infravermelho de proteínas	35
4 ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL 2D	
APPLICADA A REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO, 2D IR	36
4.1 Análise de correlação 2D	37
4.2 Função de correlação 2D	38
4.3 Informações advindas dos espectros de correlação 2D síncrono e assíncrono	
.variável-variável	39
5 PROTEÍNA DE TRABALHO	41
5.1 Aplicações papaína	43
6.OBJETIVOS	44
6.1 Objetivos gerais	44
6.2 Objetivos específicos	44
7. MATERIAIS E MÉTODOS	45
7.1 Espectroscopia de fluorescência	45
7.2 Espectroscopia de infravermelho	45
7.3 Obtenção dos espectros de correlação variável variável e <i>Sample sample</i>	46

7.3.1 Variável-variável síncrono	46
7.3.2 Espectro de correlação variável variável assíncrono	47
7.3.3 Espectro de correlação síncrona <i>Sample-sample</i>	48
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
8.1 Fluorescência	49
8.2 Espectroscopia de correlação síncrona <i>Sample-sample</i>	53
8.3 Espectroscopia de correlação bidimensional variável variável 2D IR	58
9 CONCLUSÃO	68
10. REFERÊNCIAS	72

1INTRODUÇÃO

Os processos envolvidos no enovelamento proteico tem sido objeto de estudo há algumas décadas, pois seu entendimento torna possível relacionar a sequência de aminoácidos de uma proteína, sua estrutura, estabilidade e função biológica. (KUMAR ; YU, 2004).

Este trabalho tem como base gerar uma contribuição para o entendimento do processo de enovelamento proteico da papaína, mapeando as temperaturas de pré transição principal e as secundárias, além de descrever a dinâmica conformacional durante o processo de desenovelamento.

Para obtenção de tais informações foram utilizadas duas técnicas espectroscópicas distintas, a técnica espectroscópica de fluorescência e a de correlação bidimensional aplicada à região do infravermelho médio. Iniciemos então com uma discussão histórica sobre os desenvolvimentos obtidos no entendimento do processo de enovelamento proteico e em seguida faremos uma abordagem sobre as técnicas espectroscópicas utilizadas.

2 O ENOVELAMENTO PROTEICO

2.1 Modelo de Anfinsen

Os primeiros trabalhos presentes na literatura sobre o mecanismo de enovelamento proteico ocorreram por volta de 1.960, realizados por Chris Anfinsen. Anfinsen através de seus estudos propôs que as proteínas podem ser desnaturadas de forma reversível. A ribonuclease A (RNase A) desnaturada por uréia e um agente redutor (2 mercaptoetanol) perde totalmente sua atividade catalítica através do rompimento de suas 4 pontes dissulfeto. Entretanto, à medida que essas substâncias são removidas, a RNase A desnaturada readquire, lenta e espontaneamente, sua estrutura tridimensional correta, restaurando quase que 100% da sua atividade catalítica com as quatro pontes dissulfeto intracadeias novamente nas mesmas posições. (ANFINSEN et al., 1961).

O trabalho de Anfinsen, portanto, estabeleceu a primeira evidência de que a sequência de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica contém toda a informação requerida para esta determinar a estrutura terciária nativa.

Mais tarde, no ano de 1973, com a publicação intitulada *Principles that govern the folding of proteins chains* na revista *Science*, Anfinsen propôs a hipótese termodinâmica do enovelamento de proteínas, que ficou conhecida como a “hipótese termodinâmica de Anfinsen”, que defende que o processo de enovelamento é governado pelo ganho de estabilidade pela passagem da condição desenovelada para a nativa, tendendo ao estado de mínima energia. (ANFINSEN,1973).

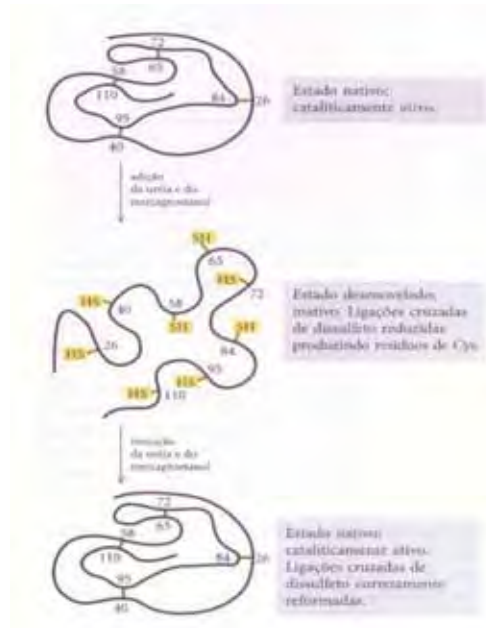


Imagem 1- Renaturaço da ribonuclease desenovelada (desnaturada). A urea é usada para desnaturar a ribonuclease e o mercaptoetanol cliva as pontes dissulfeto para produzir 8 resíduos de Cys Fonte: Lehninger (2006. p.147).

2.2 Modelo de dois estados

Por volta de 1968, o modelo vigente para explicar o processo de enovelamento proteico era o modelo de dois estados. Charles Tanford, estudando esse processo, constatou que o mecanismo de desnaturação proteica, induzidos por pH, temperatura, urea e hidrocloreto de guanidínio não eram equivalentes, gerando formas estruturalmente distintas (TANFORD, 1970). Com isso, seus experimentos abriram as portas para questões importantes como a possibilidade de estados intermediários no processo de enovelamento proteico, e, além disso, caso estes existam, como esses poderiam ser detectados.

2.3 Paradoxo de Levinthal

Se o enovelamento proteico era uma reação de dois estados, então o tempo de enovelamento poderia ser estimado através de um processo aleatório. Isto é, o enovelamento duraria o tempo necessário para que a proteína visitasse todas as suas possíveis conformações

até encontrar sua conformação correta. Entretanto, um cálculo simples, realizado pela primeira vez por Cyros Levinthal demonstra convincentemente que isso não pode ocorrer (LEVINTHAL, 1968). Levinthal mostrou que para uma proteína de 100 resíduos de aminoácidos, o tempo necessário de enovelamento seria maior que a idade do universo (Paradoxo de Levinthal). Considerando que um aminoácido pode estar em um de dois estados possíveis, a proteína possui um total de 2^{100} conformações possíveis. Como a passagem de uma conformação para outra leva cerca de um picossegundo (10^{-12}), seriam necessários aproximadamente $4 \cdot 10^{10}$ anos para que uma proteína visitasse todas as possíveis conformações. Dessa forma, os pesquisadores da época concluíram que existiam caminhos intermediários no processo de enovelamento proteico e, então propuseram a existência de uma via a ser seguida durante esse processo. Ou seja, o processo de enovelamento, que é espontâneo, ainda seria acompanhado por uma diminuição na energia livre, mas seguiria uma determinada via. Com isso, iniciou-se uma busca por maneiras de desvendar o mecanismo de tais vias.

2.4 O estado intermediário Molten Globule

Acreditava-se que caracterizando os estados intermediários, seria possível entender as interações que permitem a proteína enovelar-se tendendo ao estado de mínima energia. Entretanto um grande obstáculo está presente no estudo de estados intermediários na via de enovelamento, que é a dificuldade de isolá-los. Ou seja, as condições desnaturantes capazes de desestabilizar a forma nativa também desestabilizariam o intermediário, de tal forma que no equilíbrio existiriam somente dois estados, o nativo (N) e o desenovelado (D); porém, notou-se que em condições levemente ácidas poderiam ser detectadas estruturas cujas características físico-químicas diferiam tanto do estado desenovelado, quanto do estado nativo e que constituiriam os intermediários. (BUCHNER; KIEFHABER, 2005).

Trabalhos atuais realizam uma caracterização desse estado intermediário por diversos pesquisadores, sendo que o descreveram como um estado compacto, desnaturado, com significativo conteúdo de estrutura secundária, similar à estrutura nativa, e estrutura terciária flexível e desordenada. Esse estado é conhecido como *molten globule*, *globule* de compacto e *molten* de ausência de estrutura terciária estável (OHGUSHI; WADA, 1983). O estado

intermediário foi primeiramente observado no estudo da α -lactalbumina (KUJIWAMA et al., 1976).

2.5 Funil de energia e relevos energéticos

O modelo mais atual para descrever o processo de enovelamento proteico foi desenvolvido a partir de evidências experimentais e alguns modelos estatísticos, e pode ser explicado como uma espécie de funil. Isto é, a proteína possui vários caminhos possíveis para alcançar a conformação nativa em que a altura do funil representa a quantidade de energia livre da proteína e a largura a entropia conformacional. (imagem 2).

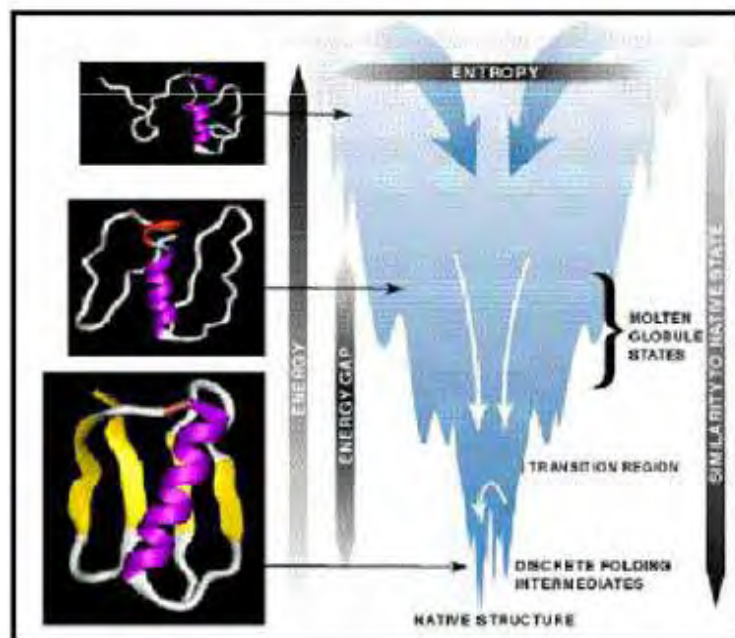


Imagem 2 - A termodinâmica do enovelamento de proteína descrita como um funil de energia livre

Fonte: <<http://qaonline.iqsc.usp.br>> Acesso em: 23 maio 2008.

O topo do funil representa a proteína no estado desenovelado, possuindo grande flexibilidade e um número de conformações grande se comparado com a proteína no estado nativo. Assim, a proteína que está se enovelando progride de um estado de alta energia livre e entropia conformacional para um estado de baixa energia livre e entropia conformacional. À medida que o enovelamento prossegue, o estreitamento do funil representa um número cada vez menor de conformações possíveis, e a sua entropia conformacional e energia livre

diminuem. Os vales no interior do funil representam conformações intermediárias (mínimos locais) que possuem baixa energia livre, porém, não aquela do estado nativo.

Evidências científicas indicam que o processo de enovelamento proteico, assim como os sistemas biológicos em geral, evoluiu de forma que as proteínas atingiram caminhos de enovelamento extremamente eficientes e conformações nativas bastante estáveis. Contudo, defeitos no enovelamento das proteínas ocorrem na natureza e algumas evidências indicam que o acúmulo de proteínas enoveladas erroneamente pode ser a causa de várias doenças como a fibrose cística, doença de Parkinson, Alzheimer e doenças neuro-degenerativas.

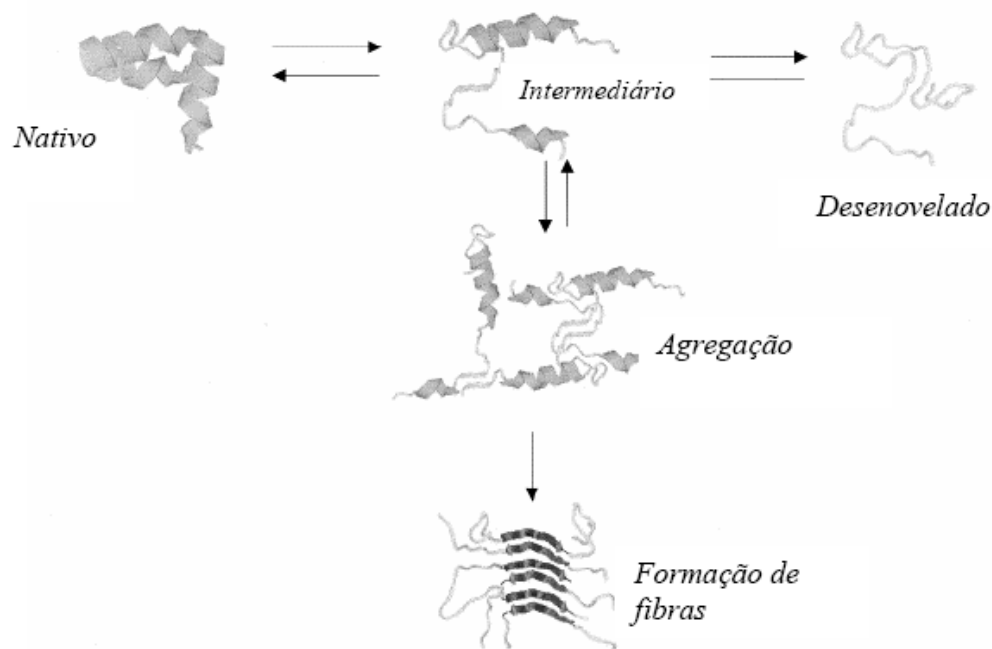


Imagem 3 - Alguns possíveis estados conformacionais das proteínas
Fonte: Smeller (2002).

3 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

3.1 Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência é um fenômeno físico que ocorre em sistemas gasosos, líquidos e em alguns tipos de sólidos. Quando uma molécula absorve um fóton, ocorre a promoção de um elétron a um estado de maior energia que em geral é também acompanhada de uma transição vibracional. (Imagem 4).

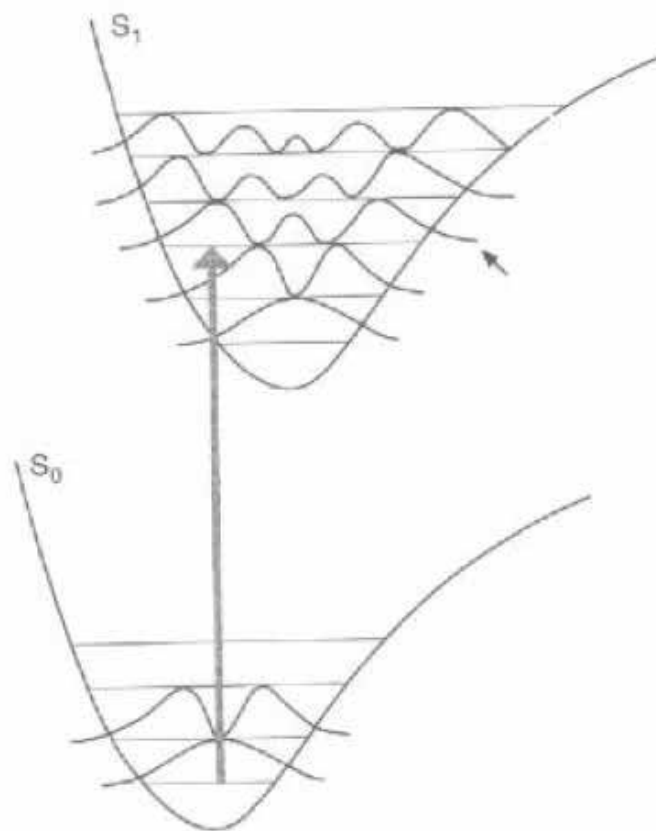


Imagem 4 - Representação da transição eletrônica de um elétron para um estado vibracional, dentro do estado excitado.

Fonte: <www.chemkeys.com>. Acesso em: 23 maio 2008.

Para o estudo de sistemas luminescentes, como é o caso da fluorescência, em geral é utilizado um diagrama parcial de níveis de energia de uma molécula, como o representado na imagem 5.

A linha horizontal grossa mais inferior representa a energia do estado fundamental da molécula, que é normalmente um estado singlete e é representado por S₀. A temperatura

ambiente esse estado representa a energia de essencialmente todas as moléculas em uma solução.

As linhas grossas superiores são os níveis de energia para os estados fundamentais vibracionais de três estados eletrônicos excitados. Numerosos níveis de energia vibracionais estão associados a cada um dos quatro estados eletrônicos, conforme sugerido pelas linhas horizontais mais finas. As linhas sinuosas representam formas de desativação do estado excitado de maneira não radiativa, podendo ser por conversão interna, externa e relaxação vibracional. As linhas pontilhadas e sólidas representam respectivamente a desativação do estado excitado por fosforescência e fluorescência, ou seja, de maneira radiativa.

Como se observa na imagem 5, a fluorescência é somente uma forma entre algumas possíveis no processo de desativação do estado excitado.

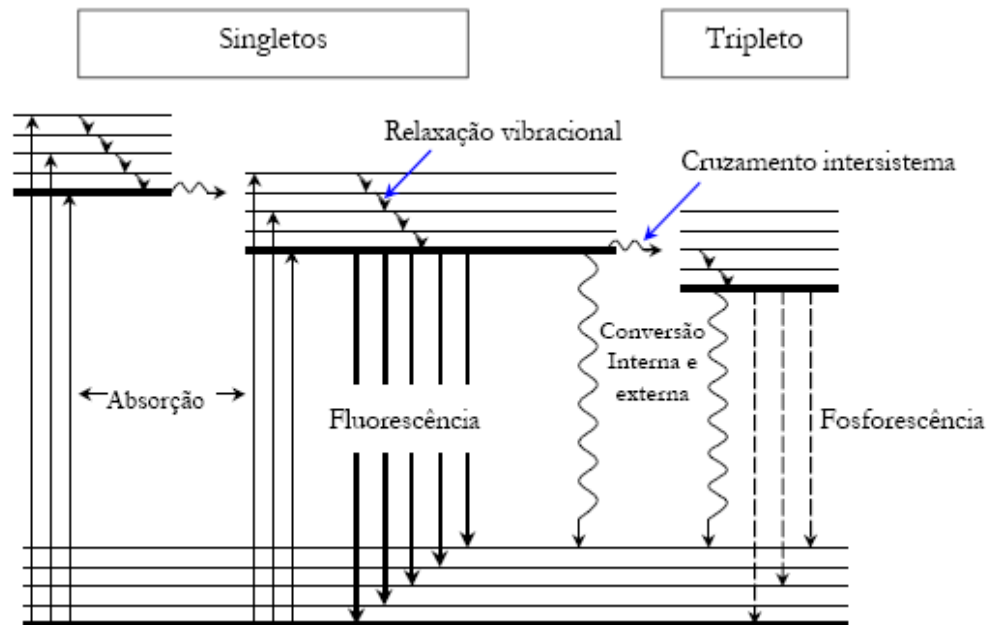


Imagem 5 - Diagrama parcial de energia de um sistema luminescente
Fonte: Skoog (2002) e Silverstein (2000).

3.1.1 Desativação do estado excitado

Após a molécula ter sido excitada, esta retorna ao estado fundamental, sendo que existe um conjunto de formas de desativação do estado excitado, e que afetam diretamente o sinal de fluorescência, dentro deles podemos citar:

3.1.2- Relaxação vibracional

Como mencionado anteriormente, a molécula pode ser levada a qualquer um de vários níveis vibracionais durante o processo de excitação eletrônica, em solução; no entanto, a energia vibracional em excesso é perdida imediatamente como consequência de colisões entre as moléculas da espécie excitada e as do solvente, e o resultado é uma transferência de energia e um aumento infinitesimal da temperatura do solvente. Esse processo é extremamente eficiente, de forma que o tempo de vida de uma molécula excitada vibracionalmente é da ordem de 10^{-12} s ou menos, um período significativamente menor que o tempo de vida médio de um estado excitado eletronicamente. Como consequência a fluorescência de uma solução quando ocorre, envolve uma transição a partir do nível vibracional mais baixo, de um estado eletrônico excitado para o estado fundamental. (SKOOG, 2002).

3.1.3 Conversão Interna:

A conversão interna é um processo no qual a molécula passa de um estado eletrônico excitado para um de menor energia sem emissão de radiação. Esses processos ainda não são bem definidos nem bem compreendidos, mas são bem eficientes devido ao fato que somente um pequeno grupo de compostos exibe a fluorescência. A conversão interna parece ser particularmente eficiente quando os dois níveis eletrônicos de energia estão próximos o suficiente para que haja uma superposição dos níveis de energia vibracionais, representado pela transição entre os dois estados singletos na imagem 5. (SKOOG, 2002).

3.1.4 Conversão externa

O processo de conversão externa, apesar de ainda não bem compreendido, é um processo no qual existe uma interação entre a molécula excitada e o solvente ou outros

solutos. A evidência para esse fenômeno é que algumas alterações na solução, como a diminuição da temperatura ou aumento da viscosidade, podem efetuar alterações na intensidade de fluorescência. (SKOOG, 2002).

3.1.5 Cruzamento intersistema

O cruzamento intersistema é um processo em que temos uma inversão no spin de um elétron. Este fato resulta em uma mudança da multiplicidade eletrônica da molécula, sendo mais provável sua ocorrência quando temos níveis vibracionais que se interpenetram e quando possuímos átomos pesados como bromo e iodo, de forma a serem mais intensas as forças de atração spin órbita e facilitada uma transição singlete-triplete. 1 (SKOOG, 2002).

3.1.6 Fluorescência

Como visto, temos vários fatores que afetam diretamente o sinal de fluorescência, quão mais eficientes forem estas formas de desativação do estado excitado, menor será o sinal de fluorescência observado. Em nosso trabalho fizemos um estudo da fluorescência da papaína com aumento de temperatura no intuito de termos alguma idéia sobre as mudanças conformacionais ocorrendo a partir de um aumento de temperatura. Cabe lembrar que a técnica de fluorescência não é uma técnica que permite dar informações estruturais, mas ajuda a dar idéias sobre o processo de desenovelamento.

3.1.7 Fluorescências de proteínas

Em proteínas, como mostra a tabela 1, apenas três aminoácidos são fluorescentes e estes aminoácidos são; fenilalanina, tirosina e triptofano. Na tabela 1 também temos representados seus $\lambda_{\text{máx}}$, e coeficientes de extinção ϵ , para comprimentos de onda distintos.

Neste trabalho a intensidade de fluorescência é medida excitando os grupos fluoróforos de triptofano.

Tabela 1 - Grupos fluoróforos pH = 6,0

Aminoácido	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Fenilalanina	260	150
	208	8000
Tirosina	272	1200
	225	8000
Triptofano	280	5500
	218	3500

Fonte: Barret e. Elmore (1998)

3.1.8 Desenovelamento proteico monitorado por espectroscopia de fluorescência

As mudanças na intensidade de fluorescência durante o processo de desenovelamento de uma proteína são em geral bastante significativas.

Em proteínas que contém triptofano, podem ser observadas mudanças tanto no deslocamento no comprimento de onda como na intensidade de fluorescência. Dependendo do ambiente que o triptofano se encontra na proteína enovelada, sua emissão pode ocorrer em comprimentos de onda maior ou menor que a emissão do triptofano livre em solução aquosa, e a intensidade de fluorescência pode tanto aumentar quanto diminuir de acordo com o processo de desenovelamento. A máxima emissão do triptofano exposto no solvente ocorre perto de 350 nm, indicando que a proteína está na sua forma desenovelada, porém em um ambiente hidrofóbico, tal como o interior da proteína enovelada, a emissão do triptofano ocorre em comprimentos de onda menores. (BUCHNER; KIEFHABER, 2.005).

Para a investigação da fluorescência do triptofano utiliza-se a excitação no comprimento de onda de 295nm, dessa forma conseguimos eliminar a influência dos demais grupos fluoróforos presentes na proteína.

A partir dos gráficos obtidos pela fluorescência é possível realizar um tratamento de dados que nos fornece a fração desnaturada de proteínas com o auxílio de uma equação do tipo de Hill; isto devido o fato de as proteínas exibirem um comportamento cooperativo entre o agente desnaturante, neste caso temperatura, e a macromolécula. Dessa forma, nesse trabalho uma equação do tipo de Hill, (eq1.6.2.1), será utilizada no tratamento dos dados.

$$y = y_0 + \frac{ax^b}{c^b + x^b} \quad (\text{Eq.I.1.6.2.1})$$

Em que y_0 , a , c , são constantes obtidas pelo gráfico da curva e b é a constante de Hill; y e x são os parâmetros provenientes dos dados em tratamento.

3.1.9 Análise dos dados de equilíbrio conformacional

Para o estudo do processo de equilíbrio conformacional, utiliza-se o modelo de dois estados, atribuindo que a proteína pode assumir dois estados possíveis que são o nativo e o desenovelado, sendo que estes em uma proteína estão em equilíbrio, e assim podemos escrever a seguinte reação química:



Temos que a constante de equilíbrio dessa reação é descrita por

$$K_{eq} = \frac{[D]}{[N]} \quad (\text{Eq.1.2.1.9.2})$$

Como possuímos dois estados possíveis, as frações N e D somam 1, logo:

$$K_{eq} = \frac{[D]}{1 - [D]} \quad (\text{Eq.1.2.1.9.3})$$

E a fração de proteína desenovelada é dada por:

$$f_D = \frac{S_{obs} - S_N}{S_D - S_N} \quad (\text{Eq.1.2.1.9.4})$$

Sendo S_{obs} o sinal observado, S_N e S_D o sinal correspondente a 100 % da proteína enovelada e desenovelada, respectivamente. Equação essa que apresenta um aspecto sigmoidal.

3.2 Espectroscopia de infravermelho

A Espectroscopia de Infravermelho é, inquestionavelmente, uma das mais importantes técnicas espectroscópicas utilizadas na atualidade. Sendo utilizada desde a realização de trabalhos de rotina tais como controle de qualidade, quanto à elucidação de estruturas moleculares de natureza relativamente complexas. O sucesso do uso desta técnica deve-se ao fato que desde o início mostrou grande potencial de associação entre os espectros obtidos através dela com as estruturas, bem como à presença de determinados grupos funcionais nos compostos.

A chamada radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à região do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. Ela compreende radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12.800 a 10 cm^{-1} ou seja um intervalo relativamente longo de números de onda, e desta forma para fins tanto de aplicação como de instrumentação, o espectro infravermelho é convenientemente dividido em radiação no infravermelho próximo, médio e distante; os limites aproximados de cada um podem ser observados na tabela 2. (SKOOG, 2002; SILVERSTEIN, 2000).

Tabela 2 - Limites da radiação espectral do infravermelho

Região	Intervalo de Comprimento de Ondas (λ), μm	Região de Número de Onda ($\bar{\nu}$), cm^{-1}	Região de Frequência (ν), Hz
Próximo	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
		(1600-17000 Amida II)	
Médio	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante	50 a 1.000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
Mais usada	2,5 a 15	4.000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

Fonte: Skoog (2002) e Silverstein (2000)

Os fótons da radiação infravermelha não possuem energia suficiente para causarem transições eletrônicas, e dessa forma causam somente transições vibracionais.

A absorção de radiação infravermelha torna-se muito mais significativa em espécies moleculares que possuem pequenas diferenças de energia entre os vários estados vibracionais e rotacionais, e desta forma não são todas as vibrações moleculares que conduzem a absorções observáveis no espectro IR. Para absorver radiação infravermelha, uma molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. Apenas nessas circunstâncias o campo elétrico oscilante da radiação pode entrar em ressonância com a molécula e uma transferência de energia resultará em uma variação da amplitude da vibração molecular; e a consequência é a absorção de radiação. De forma análoga, a rotação de moléculas assimétricas em torno dos seus centros de massa resulta em uma variação periódica do dipolo que pode interagir com a radiação. A intensidade da absorção aumenta com a polaridade crescente das ligações vibrando. (BARTH 2007).

3.2.1 Tipos de vibrações moleculares

As posições relativas dos átomos em uma molécula não estão fixadas exatamente; variam continuamente como consequência de inúmeros tipos de vibrações e rotações em torno das ligações da molécula. Para uma molécula diatômica ou triatômica simples, é fácil definir o número e a natureza de tais vibrações e relacioná-las a energias de absorção. Entretanto uma análise desse tipo fica difícil, se não impossível, para moléculas constituídas de muitos átomos. Não apenas as moléculas grandes têm um grande número de centros de vibração, como também interações entre vários centros podem ocorrer e precisam ser levadas em conta. (SKOOG, 2002; SILVERSTEIN, 2000).

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais (também conhecida como estiramento) e deformações angulares. Uma vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação que faz com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente. As vibrações de deformação angular correspondem a variações ritmadas de ligações que têm um átomo em comum ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem. Assim, por exemplo, as vibrações de deformação angular envolvem alteração dos ângulos de ligação em relação a um conjunto de coordenadas arbitrário da molécula. As vibrações de deformação angular são de quatro tipos: tesoura (*scissoring*), balanço (*rocking*), sacudida (*wagging*) e torção (*twisting*). Imagem 6.

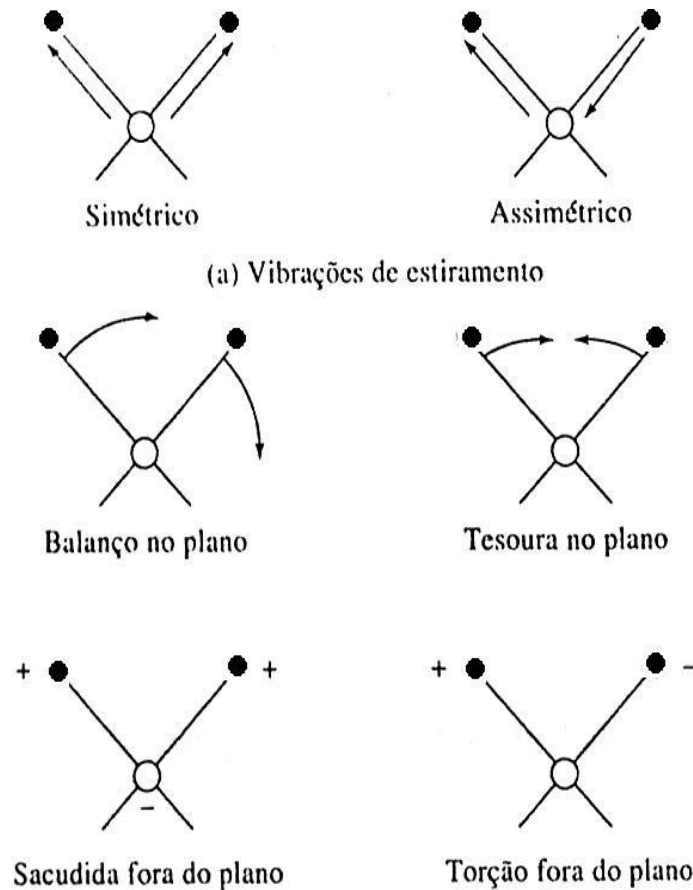


Imagem 6 - Vibrações de deformação angular.
 Fonte: Skoog, (2002) e Silverstein (2000)

Em uma molécula contendo mais de dois átomos todos os tipos de vibração mostrados na figura 6 são possíveis. Além disso, interação ou acoplamento de vibrações pode ocorrer se as vibrações envolvem ligações de um mesmo átomo central. O resultado de um acoplamento é uma variação nas características das vibrações envolvidas.

3.2.2 Modelo mecânico de uma vibração de estiramento em uma molécula diatômica

As características de uma vibração de estiramento podem se aproximar às de um modelo mecânico consistindo de duas massas ligadas por uma mola. Uma perturbação de uma

das massas ao longo do eixo que contém a mola resulta em uma vibração denominada *movimento harmônico simples* (MHS) (SKOOG, 2002).

O modelo mais simples de uma molécula vibrando descreve um átomo ligado a uma massa muito grande por uma mola de peso desprezível. A força que é necessária para mover o átomo de certa distância y de uma posição de equilíbrio é proporcional a *constante de força* k , isto é, utiliza-se a lei de Hooke, Eq.1.3.2.1. O sinal negativo indica que a força é do tipo restauradora e, portanto tende a restabelecer o equilíbrio.

$$F = -ky \quad \text{Eq. (1.3.2.1)}$$

De acordo com a segunda lei de Newton, a força é também proporcional a massa e sua aceleração, a segunda derivada da elongação com respeito ao tempo t :

$$F = ma = m \frac{d^2 y}{dt^2}, \quad \text{Eq.(1.3.2.2)}$$

as equações 1.3.2.1 e 1.3.2.2 podem ser combinadas, resultando em:

$$m \frac{d^2 y}{dt^2} = -ky \quad \text{Eq.(1.3.2.3)}$$

Uma solução para essa equação tem que ser uma função periódica tal que sua segunda derivada seja igual à função multiplicada por $-(k/m)$. Uma relação de cosseno preenche essa condição. Assim, o deslocamento instantâneo da massa no tempo t pode ser escrito como

$$y = A \cos(2\pi v_m t + \varphi) \quad , \text{Eq.(1.3.2.4)}$$

Em que v_m é a frequência vibracional natural e φ é o ângulo de fase, A é a amplitude máxima do movimento, descrevendo o movimento do átomo como um oscilador harmônico. A segunda derivada da equação (1.3.2.4) em relação ao tempo pode ser escrita como

$$\frac{d^2 y}{dt^2} = -4\pi^2 v_m^2 A \cos(2\pi v_m t + \varphi) = -4\pi^2 v_m^2 y \quad , \text{Eq.(1.3.2.5)}$$

Substituindo a equação 1.3.2.4 e 1.3.2.5 na equação 1.3.2.3 temos:

$$\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad , \quad \text{Eq.(1.3.2.6)}$$

Em que ν_m é a *frequência natural* do oscilador harmônico mecânico. Embora ela seja dependente da constante de força da mola e da massa do corpo ligado, a frequência natural é independente da energia fornecida ao sistema; variações na energia resultam meramente em uma variação na amplitude A da vibração.

Considerando agora uma molécula diatômica de massas m_1 e m_2 , a massa μ é chamada *massa reduzida* dessa molécula diatômica. Para isso, é necessário apenas substituir-se a única massa m pela massa reduzida, onde:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad \text{Eq.(1.3.2.7)}$$

Assim, tem-se uma equação que descreve a frequência de vibração de uma molécula diatômica:

$$\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}} \quad \text{Eq.(1.3.2.8)}$$

Normalmente faz-se a aproximação de que o comportamento de uma vibração molecular é análogo ao do modelo mecânico descrito. Assim, a frequência da vibração molecular é calculada pela equação 1.3.2.8, substituindo-se as massas m_1 e m_2 pelas massas dos átomos na equação 1.3.2.7 para se obter μ ; a grandeza k é a constante da força da ligação química, que é uma medida de sua rigidez. (SKOOG, 2002)

3.2.3 Tratamento quântico das vibrações

As equações da mecânica clássica, como descritas até agora, não detalham completamente o comportamento de partículas de dimensões atômicas. Por exemplo, a

natureza quantizada das energias vibracionais moleculares e outras energias moleculares e atômicas também não aparecem nessas equações. Pode-se, no entanto, usar o conceito do oscilador harmônico simples para desenvolver as equações de onda da mecânica quântica. As soluções dessas equações para as energias potenciais têm a forma:

$$E = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Eq.(1.3.3.1)}$$

Sendo h a constante de Planck e ν o *número quântico vibracional*, que pode tomar apenas valores positivos e inteiros (incluindo zero, $\nu = 0, 1, 2, 3, \dots$). Assim, em contraste com a mecânica clássica, onde a energia potencial pode assumir qualquer valor, na mecânica quântica vê-se que o oscilador harmônico quântico pode assumir apenas valores discretos de energia.

É interessante notar que o fator $(\sqrt{k/\mu})/2\pi$ aparece em ambas às equações, clássica e quântica; substituindo a equação 1.3.2.8 na equação 1.3.3.1 encontra-se:

$$E = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) h\nu_m \quad , \quad \text{Eq. (1.3.3.2)}$$

Em que ν_m é a frequência vibracional do modelo clássico.

Supondo que as transições entre os níveis de energia vibracionais possam ser causadas por absorção de radiação, desde que a energia da radiação seja exatamente igual à diferença dos níveis de energia ΔE , entre os estados quânticos vibracionais, bem como que a vibração cause uma variação de dipolo. Essa diferença é idêntica entre quaisquer pares de níveis adjacentes, uma vez que ν nas equações 1.3.3.1 e 1.3.3.2 pode assumir apenas valores inteiros, isto é:

$$\Delta E = h\nu_m = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Eq. (1.3.3.3)}$$

À temperatura ambiente, a maioria das moléculas está no estado fundamental ($\nu = 0$); assim, da equação 1.3.3.2,

$$E_0 = \frac{1}{2} h\nu_m. \text{ Eq.1.3.3.4}$$

Uma promoção ao primeiro estado excitado ($\nu = 1$) com energia

$$E_1 = \frac{3}{2} h\nu_m, \text{ Eq.1.3.3.5}$$

Requer radiação com energia:

$$\left(\frac{3}{2} h\nu_m - \frac{1}{2} h\nu_m \right) = h\nu_m. \text{ Eq. 1.3.3.6}$$

A frequência da radiação ν que irá causar essa variação é idêntica à frequência vibracional clássica da ligação ν_m . Isto é:

$$E_{\text{radiação}} = h\nu = \Delta E = h\nu_m = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \text{ Eq.1.3.3.7}$$

Ou

$$\nu = \nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Eq. 1.3.3.8}$$

Expressando a radiação em números de onda, tem-se:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = 5,3 \times 10^{-12} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Eq.(1.3.3.9)}$$

Sendo $\bar{\nu}$ é o número de onda de um pico de absorção em cm^{-1} , k é a constante de força para a ligação em newtons por metro (N/m), c é a velocidade da luz em cm/s e a massa reduzida μ , definida pela equação 1.3.2.7, tem unidades de kg.

A equação 1.3.3.9 e as medidas no infravermelho permitem a avaliação de constantes de força para vários tipos de ligações químicas. Geralmente, observa-se que k se situa entre 3×10^2 e 8×10^2 N/m para a maioria das ligações simples, sendo 5×10^2 um valor médio razoável. Observa-se que as ligações duplas e triplas, do mesmo modo, têm constantes de força cerca de duas a três vezes esse valor (1×10^3 e $1,5 \times 10^3$, respectivamente). Com esses valores médios experimentais, a equação 1.3.3.9 pode ser usada para se estimar o número de onda do pico fundamental de absorção, ou o pico de absorção devido à transição do estado fundamental ao primeiro estado excitado vibracional, para uma variedade de tipos de ligação.

3.2.4 Regras de seleção

Conforme as equações 1.3.3.2 e 1.3.3.3, a energia para uma transição do nível 1 para o nível 2 ou do nível 2 para o nível 3 deveria ser idêntica à da transição de 0 para 1. Mais ainda: a teoria quântica indica que as únicas transições que poderiam ocorrer seriam aquelas em que o número quântico vibracional muda de uma unidade, isto é, a assim chamada *regra de seleção* diz que $\Delta v = \pm 1$. Uma vez que os níveis vibracionais são igualmente espaçados, apenas um único pico de absorção deveria ser observado para certa vibração molecular. (SKOOG, 2002).

3.2.5 Oscilador anarmônico

Até agora, considerou-se os tratamentos clássico e mecânico-quântico de um oscilador harmônico. A energia potencial de tal vibrador muda periodicamente à medida que a distância entre as massas varia, (Curva 1 imagem 7). A partir de considerações qualitativas, no entanto, essa descrição de uma vibração molecular parece imperfeita. Por exemplo, à medida que dois átomos se aproximam a repulsão coulombiana entre os dois núcleos produz uma força que age na mesma direção da força de restauração da ligação; assim, espera-se que a energia potencial cresça mais rapidamente do que o modelo do oscilador harmônico prevê. No outro extremo da oscilação, um decréscimo na força de restauração e, portanto, da energia potencial, ocorre quando a distância interatômica se aproxima daquela em que ocorre a dissociação.

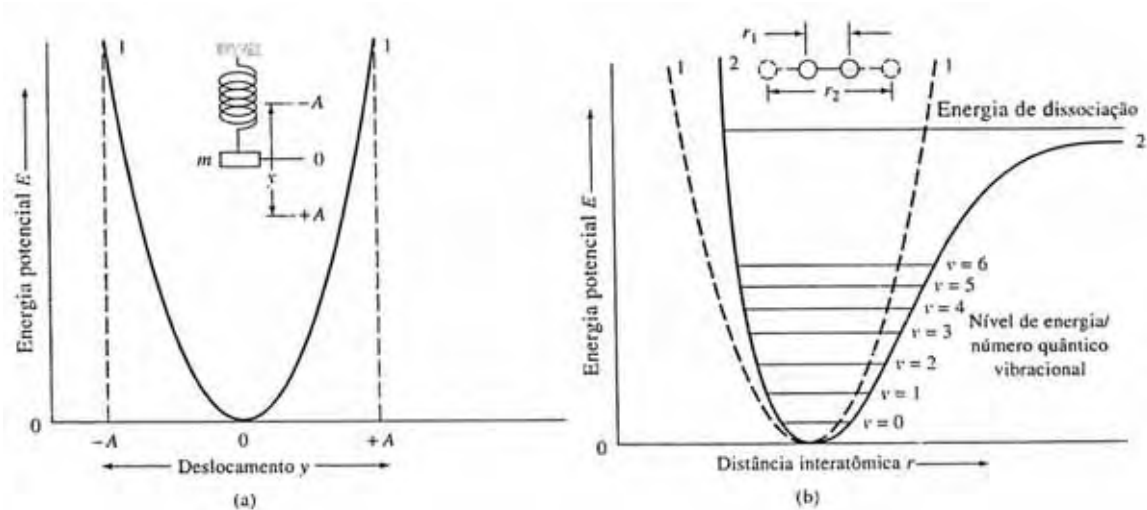


Imagem 7- Diagrama de energia potencial. Curva 1, oscilador harmônico. Curva 2, oscilador anarmônico.

Fonte: Skoog (2002)

Na teoria, as equações de onda da mecânica quântica permitem a obtenção de curvas de energia potenciais mais corretas para vibrações moleculares. Qualitativamente, as curvas têm que tomar a forma *anarmônica* mostrada na curva 2 da Imagem 7. Tais curvas se diferenciam do comportamento harmônico em vários aspectos, dependendo da natureza da ligação e dos átomos envolvidos. No entanto, as curvas harmônicas e anarmônicas são muito parecidas para energias potenciais pequenas. Esse fato explica o sucesso dos métodos aproximados descritos.

O comportamento anarmônico conduz a desvios de duas espécies. Em números quânticos altos, ΔE se torna menor, e a regra de seleção não é seguida rigorosamente; como resultado, transições de $\Delta v = \pm 2$ e ± 3 são observadas. Tais transições são as responsáveis pelo aparecimento de linhas harmônicas (não-fundamentais) em frequências aproximadamente duas ou três vezes a da linha fundamental: a intensidade de absorção dessas linhas harmônicas é frequentemente pequena e os picos podem não ser observados.

Os espectros vibracionais são ainda complicados pelo fato que duas vibrações diferentes em uma molécula podem interagir para dar picos de absorção com frequências que são aproximadamente as somas ou diferenças das suas frequências fundamentais. Novamente, as intensidades dos picos de combinação ou diferença geralmente são baixas.

3.2.6 Espectros de infravermelho de proteínas

O presente trabalho realiza análise das vibrações na estrutura secundária de proteínas, em específico da papaína, dessa forma a tabela 3 nos mostra os números de onda e as estruturas características a esses determinados números de onda. Cabe ressaltar que trabalhos contemporâneos nos indicam que números de onda em torno de 1615 e 1625 cm^{-1} nos dão indício de contato intercadeias laterais e contato intercadeias laterais de folha β , respectivamente.

Tabela 3 - Baseada nos dados experimentais e atribuições de vários autores coletada e avaliada por Goormaghtigh et. al. para a posição na banda de amida I das vibrações de estruturas secundárias em D_2O . Ou seria

Estrutura Secundária	Média (cm^{-1})	Extremos (cm^{-1})
α-hélice	1652	1642 - 1660
Folha-β	1630 ; 1679	1615 – 1638 ; 1672 - 1694
Voltas	1671	1653 – 1691
Desordenada	1645	1639 - 1654

Fonte: Goormaghtigh et al. (1994)

4 ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL 2D APLICADA A REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO, 2D IR

A espectroscopia de correlação bidimensional é uma técnica que consiste em representar a intensidade espectral em função de duas variáveis espectrais, variáveis estas que são ortogonais e independentes entre si, formando dessa forma um plano espectral 2D, e a intensidade de correlação espectral (que pode ser advinda de dados de infravermelho, dicroísmo circular, fluorescência, entre outras), é representada ao longo do terceiro eixo. Com o auxílio de tais espectros podemos obter simplificação de alguns espectros de difícil análise, devido a muitas bandas superpostas, podemos obter uma melhoria da resolução espectral, além de podermos identificar várias interações inter e intramoleculares através da correlação seletiva dos picos.

A proposição de expandir os picos espectrais em uma segunda dimensão para uma melhoria da visualização de espectros complexos devido à superposição de muitas bandas sobrepostas teve origem na espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e foi proposta pelo físico belga Jean Jeener em 1971 durante o “AMPERE Summer School”. Na técnica de RMN, realizam-se perturbações através de pulsos com um período t_1 , entretanto as técnicas tais como fluorescência e infravermelho são governadas por fenômenos físicos que apresentam escalas de tempo muito diferentes das encontradas em RMN, as vibrações moleculares são muito mais rápidas (picossegundos) que os processos de relaxação de spin (microsegundos ou mais) encontrados em RMN.

Devido a esta dificuldade aparente de aplicação da análise de correlação 2D às demais técnicas espectroscópicas, uma primeira proposta foi sugerida por Noda, em 1986, com relação à espectroscopia de correlação bidimensional no Infravermelho médio (2D-IR). Ao contrário dos métodos de Transformada de Fourier dupla sobre os pulsos múltiplos de excitação empregados em RMN 2D, uma análise de correlação cruzada simples foi aplicada a sinais IR dinâmicos com variação senoidal, a fim de se obterem espectros de correlação (2D-IR).

O processo de obtenção de dados pode ser representado através da seguinte imagem:

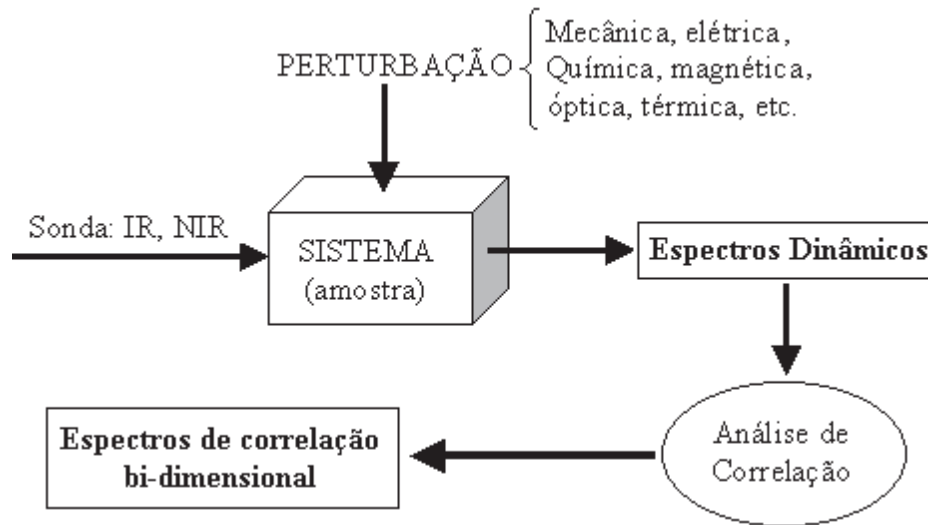


Imagem 8 - Fluxograma de obtenção de dados na espectroscopia de correlação bidimensional.

Uma sonda atua no sistema. Fazemos incidir na amostra um tipo de perturbação: coletamos os espectros chamados de dinâmicos, apesar de no caso dos coletados neste trabalho não serem obtidos em resolução temporal. Após esta coleta de dados faz-se a análise dos dados de forma a obter os espectros de correlação bidimensional. (NODA, 1990).

4.1 Análise de correlação 2D

Primeiro define-se o espectro dinâmico $y(v, t)$ de uma amostra afetada pela perturbação este é dado por:

$$\tilde{y}(v, t) = \begin{cases} y(v, t) - \bar{y}(v), & \text{para } T_{\min} \leq t \leq T_{\max} \\ 0, & \text{para qualquer outra situação} \end{cases}$$

Eq.1.4.1.1

Onde $y(v)$ é o espectro de referência da amostra ou sistema. O espectro de referência, por sua vez, pode ser obtido de diversas formas. Normalmente esta referência é assumida como o espectro estacionário ou médio definido por:

$$\bar{y}(v) = \frac{1}{T_{\max} - T_{\min}} \int_{T_{\min}}^{T_{\max}} y(v, t) dt \quad \text{Eq. 1.4.1.2}$$

O espectro de referência pode também ser adotado como o espectro observado em algum ponto de referência como antes do início da perturbação ($t \rightarrow -\infty$), após seu efeito ter se extinguido ($t \rightarrow +\infty$) ou a um intervalo fixo após sua aplicação ao sistema. O espectro de referência pode ainda ser presumido como sendo igual a zero. Neste caso, o espectro dinâmico iguala-se à variação da intensidade espectral observada sob efeito da perturbação. (NODA, I., 1990).

4.2 Função de correlação 2D

A função correlação é uma função de dois conjuntos de dados (função correlação cruzada) ou de um conjunto de dados (função de autocorrelação). A função correlação é algumas vezes chamada de *detector de Elvis*. É utilizada habitualmente para detectar a presença de um sinal conhecido no ruído. Por exemplo, a função correlação pode ser usada para detectar a presença de um rosto (como o de Elvis) em uma multidão, para comparar impressões digitais ou padrões de vasos sanguíneos da retina para identificar pessoas .

A função de correlação cruzada atinge seu valor máximo para um retardo que corresponde ao intervalo de tempo de chegada de um sinal que lembra a réplica armazenada. O valor máximo é uma medida da semelhança do sinal recebido e da réplica armazenada. O valor máximo é 1 quando há uma coincidência perfeita.

A correlação 2D nada mais é que uma comparação de variações de intensidade espectrais observadas em duas variáveis espectrais diferentes, sob um intervalo de observação finito entre T_{\min} e T_{\max} . Portanto, o espectro de correlação pode ser escrito como:

$$X(v_1, v_2) = \langle \tilde{y}(v_1, t) \cdot \tilde{y}(v_2, t') \rangle \quad \text{Eq.1.4.2.1}$$

Em que $\mathbf{X}(v_1, v_2)$ nos dá a intensidade de correlação 2D e os dois símbolos $\langle \rangle$ denotam qualquer classe de funções de correlação para comparar as duas intensidades em relação a \mathbf{t} .

A função $\mathbf{X}(v_1, v_2)$ é tratada convencionalmente como um número complexo, dessa forma escreve suas duas componentes, a real e a complexa e esta é dada por:

$$\mathbf{X}(v_1, v_2) = \Phi(v_1, v_2) + i\Psi(v_1, v_2) \quad \text{Eq.1.4.2.2}$$

Compreendendo dois componentes ortogonais conhecidos como intensidades de correlação síncrona e assíncrona, respectivamente.

A correlação 2D síncrona $\Phi(v_1, v_2)$ representa a similaridade entre as duas variações espectrais medidas em variáveis espectrais diferentes quando o valor de \mathbf{t} é alterado. A correlação 2D assíncrona $\Psi(v_1, v_2)$ pode ser considerada como a não-similaridade das variações espectrais. (NODA, 1990).

4.3 Informações advindas dos espectros de correlação 2D síncrono e assíncrono variável-variável

O espectro de correlação 2D síncrono representa mudanças na intensidade espectrais simultâneas ou coincidentes, e é constituído por auto-picos (presentes na diagonal principal), cuja intensidade reflete as regiões do espectro que tem maior correlação sob efeito da perturbação externa. Os picos cruzados (localizados fora da diagonal), descrevem as mudanças de intensidade espectral entre duas variáveis espectrais diferentes v_1 e v_2 . Dessa forma com o espectro de correlação síncrona conseguimos observar quais as regiões espectrais que foram afetadas pelo processo de perturbação e além disso se as alterações ocorreram na mesma direção ou se ocorreram em direções opostas. Em um espectro 2D síncrono, picos cruzados negativos indicam que as mudanças de intensidade observadas em duas coordenadas espectrais ocorrem em anti-similaridade, isto é, estão fora de fase, implicando que uma variável antecipa a outra. Um pico cruzado positivo, por outro lado, indica que as mudanças de intensidade estão ocorrendo similarmente, isto é, ambas as variáveis respondem em conjunto ao estímulo externo. (NODA 1990).

O espectro de correlação 2D assíncrono informa sobre as respostas espectrais que ocorrem fora de fase com a perturbação externa, ou seja, o espectro assíncrono positivo revela

se a alteração na intensidade espectral ocorre predominantemente em v_1 antes de v_2 , e se o espectro assíncrono for negativo temos o oposto. Desta forma conseguimos mapear a sequência de eventos que ocorrem na amostra durante todo o processo de perturbação.

Abaixo são mostrados dois espectros um de correlação síncrono e um de correlação assíncrono.

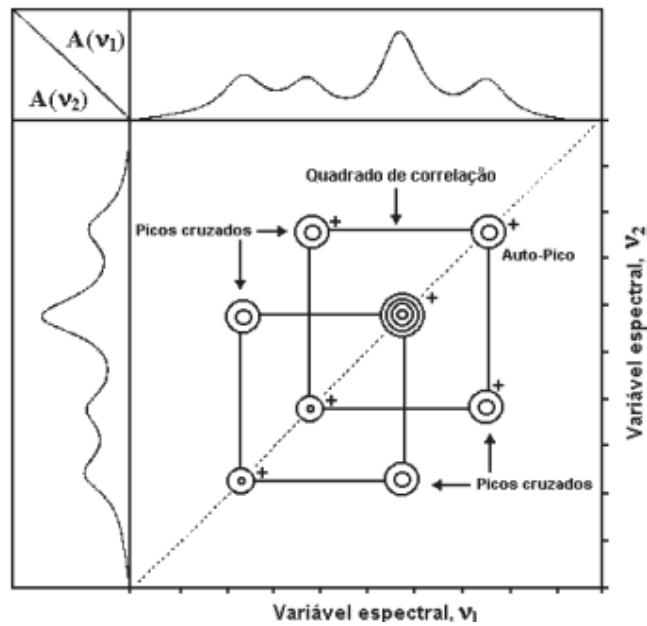


Imagem 8 -Espectro de correlação síncrono (mapa de contorno)
Fonte: Noda (1990).

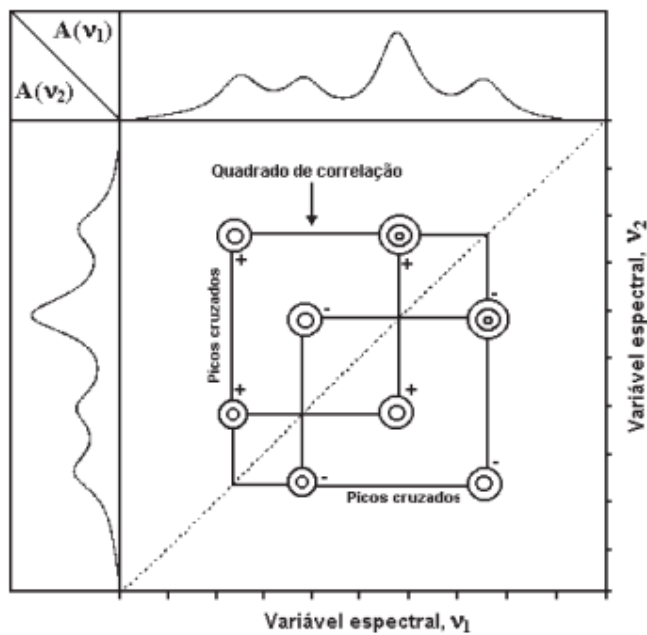


Imagem 9 - Espectro de correlação assíncrono (mapa de contorno)

5 PROTEINA DE TRABALHO

A proteína de trabalho é uma enzima, sendo que com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, (ribozimas), todas as enzimas são classificadas como proteínas (VOET, D.; VOET, J.G 1.995).

Esta enzima é classificada como uma endopeptidase, mais precisamente como uma cisteíno-peptidases devido a sua baixa especificidade e por possuir uma cisteína presente no seu sítio catalítico. (Imagem 11). Foi bastante estudada, sendo que das enzimas de sua classe esta foi a primeira a possuir sua estrutura tridimensional resolvida (Ménard, 1993).

De acordo com a modelagem molecular realizada, ela possui 31% de hélices, 20% de folhas β e 49% de voltas e aleatório. (imagem 12).

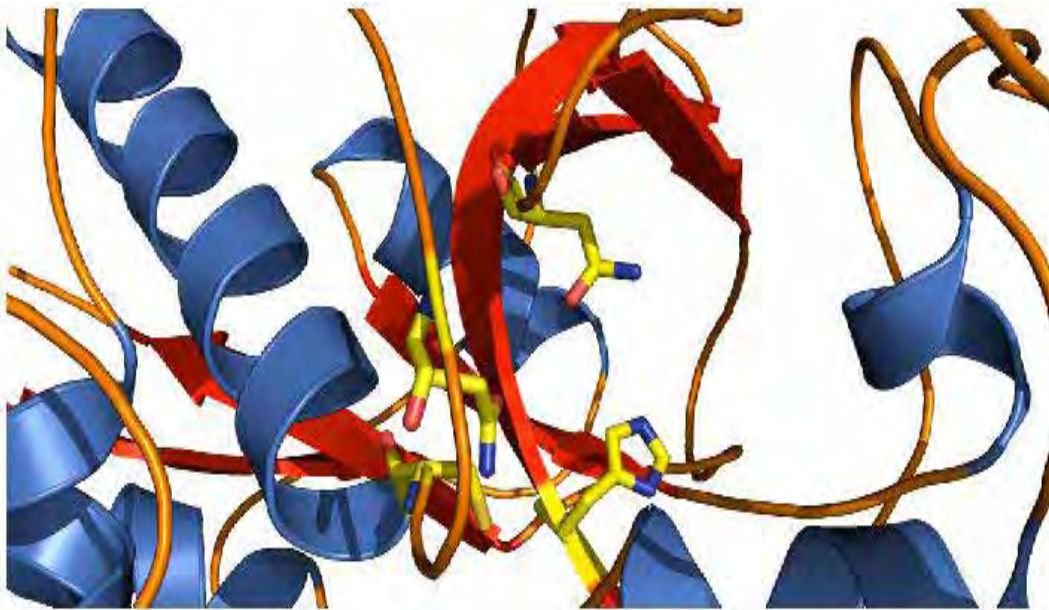


Imagem 10 - Sítio catalítico da papaína, obtida através do programa SWISS PDB. Código PDB 3.4.22.2

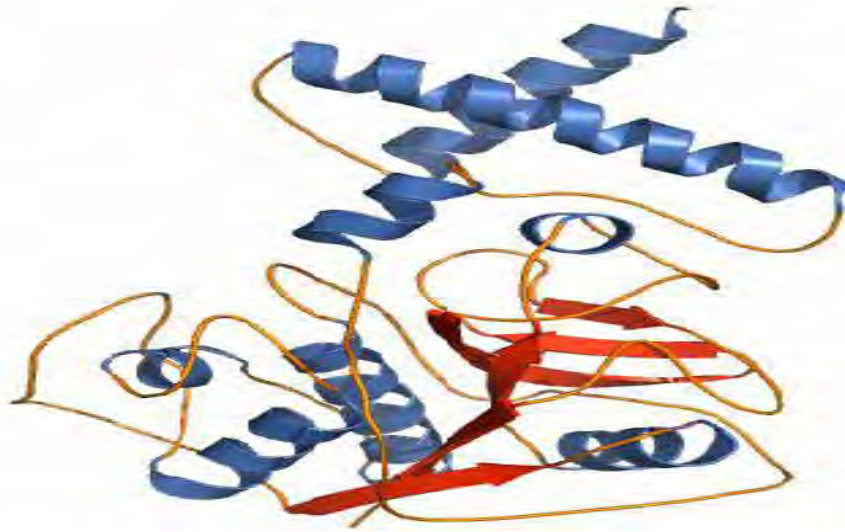


Imagem 11 - Estrutura tridimensional da papaína, obtida através do programa SWISS PDB. CódigoPDB 3.4.22.2

A molécula da papaína contém sete resíduos de cisteína, sendo que 6 destes realizam 3 ligações dissulfeto, e a cisteína-25 está envolvida com o sítio catalítico. (LOWE, 1976). Possui também sete resíduos de triptofano sendo que alguns estão em regiões mais hidrofóbicas e outros mais expostos ao meio (imagem 12). Possui 212 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 23,406kDA, $Pi = 6,82$.

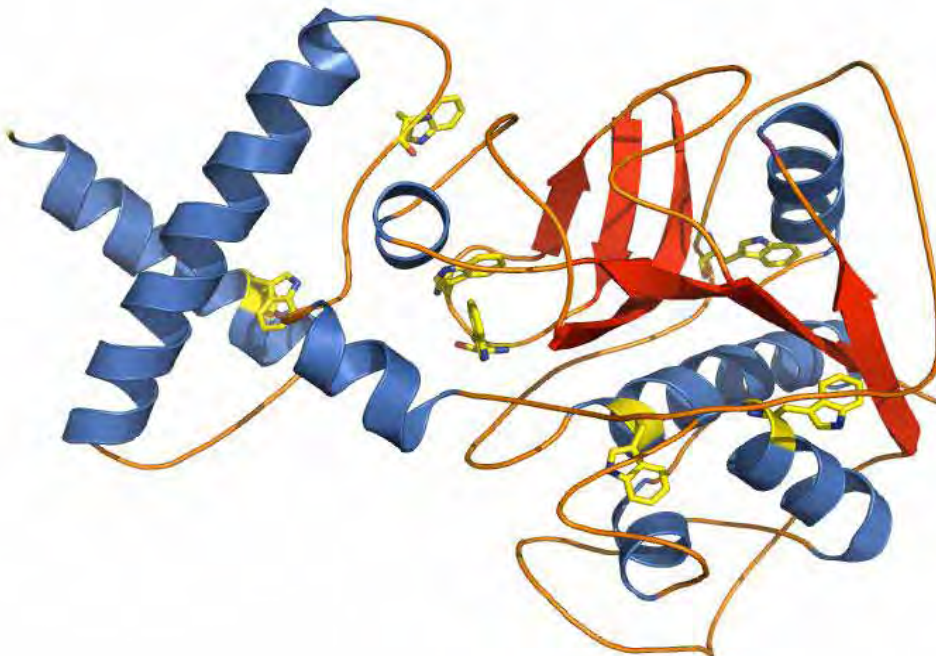


Imagem 12 - Resíduos de triptofano da papaína, imagem obtida através do programa SWISS PDB Código PDB 3.4.22.2

5.1 Aplicações da papaína

A papaína possui um leque muito grande de aplicações, dentro das quais podemos citar:

- ✓ Clarificação e estabilização de cerveja (chill-proofing): a indústria de cerveja tem sido o principal consumidor de papaína, com cerca de 75% da demanda.
- ✓ Amaciamento de carnes (tenderizing): a papaína é uma enzima capaz de romper fibras da carne bovina tornando-a mais macia.
- ✓ Indústria farmacêutica: é utilizada na produção de produtos medicinais, como ajudante digestivo em pacientes com dispepsia crônica ou gastrite, de higiene pessoal, como remoção de cravos, verrugas, tratamento de cicatrizes, depilação e limpeza de pele e também na produção de cosméticos, creme dental e perfumes.
- ✓ Indústria de couros: hoje ocupa posição de destaque no país, seja pela venda de produtos no mercado interno ou no mercado externo.
- ✓ Indústria têxtil: é utilizada no tratamento da seda e da lã.
- ✓ Tratamento de resíduos: é uma área promissora, sejam os resíduos de natureza residencial ou industrial, pois estes apresentam odores desagradáveis e encerram substâncias de natureza proteica na sua composição. Assim, é utilizada para romper as ligações peptídicas, facilitando o tratamento dos resíduos por agentes microbianos.
- ✓ Nutrição animal: animais monogástricos, como suínos, têm dificuldade em digerir as proteínas que ingerem, diminuindo o aproveitamento das rações e aumentando o custo da produção.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivos gerais

Realizar um estudo do processo de desenovelamento da papaína com o auxílio das técnicas espectroscópicas de fluorescência, e correlação bidimensional na região do infravermelho médio nas formas *Sample-Sample* e *variável-variável*.

6.2 Objetivos específicos

Realizar uma análise da dinâmica conformacional durante o processo de desenovelamento térmico da papaína, relacionar a dinâmica conformacional com a perturbação externa e obter as temperaturas de pré-transição.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

Como foram utilizadas duas técnicas espectroscópicas fazemos a descrição dos materiais e métodos aplicados a cada uma das técnicas.

7.1 Espectroscopia de fluorescência

Para a realização das medidas de fluorescência foi utilizada a papaína comercial obtida junto a Sigma Aldrich, cujo código é 76216, com grau de pureza de 99%, segundo especificações do próprio fabricante, suspensa em tampão de Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 e 0,1 M de NaCl. A concentração de 0,02mg/ml. As amostras eram sempre preparadas no dia anterior à realização do experimento, (overnight).

Para a coleta dos dados, o intervalo de temperatura usado foi de 25°C até 70° C sendo que a cada 10°C foi realizada uma coleta até atingir 65°C, e após realiza-se uma medida a 70°C. O outro conjunto de medidas realizado utilizou o mesmo intervalo de temperatura, só que o incremento de temperatura utilizado foi de 5°C. Foram utilizadas cubetas de quartzo com capacidade de 3ml, e o monitoramento da temperatura foi realizado com o auxílio de um termopar tipo k.

7.2 Espectroscopia de infravermelho

Para realizar as medidas da espectroscopia de infravermelho foi utilizada a mesma papaína comercial descrita nos materiais e métodos da técnica espectroscópica de fluorescência, só que a uma concentração de 20mg/ml suspensa em tampão a base de deutério, tris-HCl, 0,05M, com NaCl 0,05M e pD 8,0. O espaçador utilizado entre as janelas foi de 56 micrometros de espessura e resolução espectral do equipamento foi de 2nm, e a amostra é preparada no dia anterior a medição, (overnight). Cabe ressaltar que o volume utilizado foi de 25µl, dessa forma apesar da concentração de proteína na solução ser alta, uma pequena quantidade de amostra é suficiente para realizar as medidas. Uma quantidade de 1mg de proteína é suficiente para preparar amostra para duas medidas, 50µl.

As medidas começaram a serem realizadas a 25°C, e a temperatura gradativamente foi elevada até 70°C, sendo que o incremento de temperatura utilizado é de 3°C, e em cada temperatura a amostra permanece um período de 10 minutos para atingir o equilíbrio térmico entre a janela e o líquido circundante da jaqueta térmica.

As medidas foram realizadas tanto para o tampão como para a solução de papaína e deutério, e a subtração foi realizada multiplicando os valores do tampão por 0,8, ou seja, subtraindo 80% dos valores do tampão da solução de papaína. Não foi realizada nenhuma suavização nos espectros de infravermelho, e realizou a correção de linha de base.

7.3 Obtenção dos espectros de correlação variável variável e *sample sample*

7.3.1 Variável variável síncrono

Para obtenção de um espectro de correlação variável-variável síncrono, fazemos um conjunto de procedimentos. Para simplificar o entendimento do processo de obtenção de tais espectros, aqui será apresentado o exemplo de obtenção do espectro para o intervalo de temperatura que se estende de 25° a 70°C, e que está presente nesse trabalho.

Primeiro coletamos os dados de absorvância de infravermelho no intervalo de números de onda de interesse, ν , nesse trabalho compreendido entre 1600 e 1700 cm^{-1} , e nas temperaturas, t , desejadas. Como a resolução espectral utilizada foi de 2 cm^{-1} , e o intervalo de absorvância envolve 100 cm^{-1} , de 1600 a 1700 cm^{-1} , então teremos ν variando de 1 a 50, ou seja 50 valores de absorvância para uma mesma temperatura. Como o incremento de temperatura utilizado foi de 3°C, dessa forma de 25° a 70° teremos 16 valores de temperatura, logo t varia de 1 a 16. Assim Y é uma matriz de dados 16x50.

$$Y = \begin{bmatrix} \tilde{y}(\nu_1, t_1) & \tilde{y}(\nu_2, t_1) & \cdots & \tilde{y}(\nu_n, t_1) \\ \tilde{y}(\nu_1, t_2) & \tilde{y}(\nu_2, t_2) & \cdots & \tilde{y}(\nu_n, t_2) \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ \tilde{y}(\nu_1, t_m) & \tilde{y}(\nu_2, t_m) & \cdots & \tilde{y}(\nu_n, t_m) \end{bmatrix}$$

Eq.II.3.1.1

O espectro de correlação síncrono é definido como:

$$\Phi_{vv} = \frac{1}{m-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{Y}$$

Eq.II.3.1.2

Dessa forma fazemos a multiplicação da matriz transposta de Y, que é do tipo (50x16), pela matriz Y (16x50), e multiplicamos por (1/15), no caso do exemplo que adotamos, pois a análise contém 16 temperaturas diferentes. Assim obtemos uma matriz quadrada do tipo (50x50), que é a matriz de correlação. O gráfico é construído colocando os valores dos números de onda no eixo x e no eixo y, e a intensidade de correlação está representada na terceira dimensão.

7.3.2 Espectro de correlação variável variável assíncrono

O espectro de correlação variável variável assíncrono é definido por:

$$\Psi_{vv} = \frac{1}{m-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{N} \mathbf{Y}$$

Eq.II.3.2.1

Para obtenção do espectro de correlação assíncrono fazemos o processo de forma bem semelhante, só que multiplicamos pela matriz de Noda, que possui a diagonal principal nula, de forma que desaparecem os autopicos presentes no espectro síncrono, e como ela é antissimétrica em relação à diagonal principal, mede a não similaridade dos eventos ocorridos durante o processo de perturbação. Esse é o parâmetro que diferencia a construção do espectro síncrono do assíncrono. A matriz de Noda é definida por:

$$\mathbf{N} = \frac{1}{\pi} \begin{bmatrix} 0 & 1 & \frac{1}{2} & \frac{1}{3} & \dots \\ -1 & 0 & 1 & \frac{1}{2} & \dots \\ -\frac{1}{2} & -1 & 0 & 1 & \dots \\ -\frac{1}{3} & -\frac{1}{2} & -1 & 0 & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \end{bmatrix}$$

Eq.II.3.2.2

Assim atribuímos aos eixos x e y os valores dos números de onda e na terceira dimensão os valores da intensidade de correlação assíncrona.

7.3.3 Espectro de correlação síncrona *Sample sample*

O espectro de correlação síncrona sample sample é definido como:

$$\Phi_{ss} = \frac{1}{n-1} \mathbf{Y} \mathbf{Y}^T$$

Eq.II.3.3.1

Para a construção do espectro de correlação síncrono sample sample, utilizamos a matriz de dados original que é uma matriz do tipo 16x50, multiplicamos por sua transposta, que é uma matriz de dados, 50x16, assim obtemos uma matriz de dados 16x16, que é a de dados de correlação. Para confeccionar o gráfico agora atribuímos os valores de temperatura nos eixos x e y e a intensidade de correlação na terceira dimensão.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Fluorescência

Para podermos ter uma visão mais abrangente do processo de desenovelamento da papaína fez-se uso de duas técnicas experimentais diferentes. Os primeiros dados analisados são os provenientes da espectroscopia de fluorescência, em que os grupos fluoróforos excitados são resíduos de triptofano, $\lambda_{\text{máx}}=295\text{nm}$. Os demais dados provenientes da espectroscopia de infravermelho.

A figura 1 mostra a dependência do sinal de intensidade de fluorescência com a temperatura. Podemos observar que há uma significativa diminuição da intensidade do sinal de fluorescência com o aumento de temperatura; isso se deve à acessibilidade crescente do solvente aos resíduos de triptofano, quando aumentamos a temperatura, desta forma facilitando a desativação do estado excitado de maneira não radiativa. A imagem 12 mostra os resíduos de triptofano da papaína, em que podemos observar que alguns resíduos estão em regiões mais internas ao passo que outros estão em regiões mais externas.

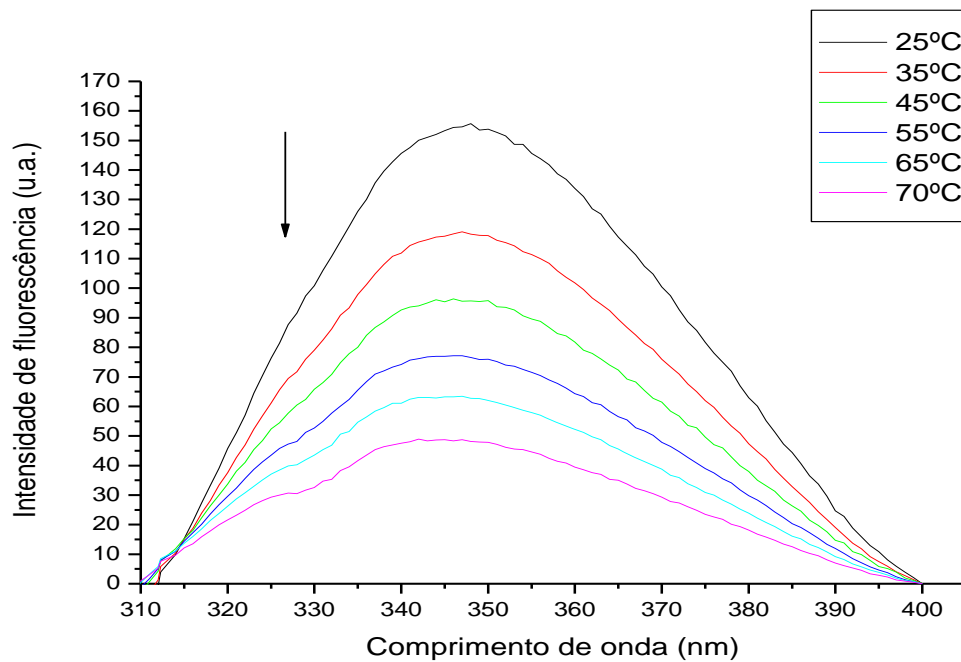


Figura 1-Variação da intensidade de fluorescência do triptofano com o aumento de temperatura

De acordo com a figura 1, podemos inferir que um aumento de temperatura gera uma mudança conformacional na proteína, isso devido à diminuição da intensidade de fluorescência, entretanto resta saber em que temperatura a proteína encontra-se totalmente desnaturada, e quais mudanças conformacionais acompanham esse processo.

Segundo Edwin e Jagannadham (1998), em 70°C a papaína esta totalmente desnaturada, e desta forma realizamos todas as medidas no intervalo de temperatura que abrange 25 até 70°C.

As figuras, 2 e 3, nos mostram a dependência da fração desenvolvida da papaína com o aumento de temperatura. Em concordância com a figura 1, quando aumentamos a temperatura do sistema, produzimos mudanças conformacionais na proteína, mudanças essas capazes de aumentar a acessibilidade dos resíduos de triptofano ao solvente e por consequência a diminuição do sinal de fluorescência.

Essa informação é necessária, pois para obtenção da fração desenvolvida utilizamos duas formas, uma que leva em consideração as áreas sob a curva do sinal de intensidade de fluorescência (figura 2), e outra que leva em consideração a intensidade de fluorescência para um comprimento de onda fixo. Para obtenção da figura 2, foi considerada a área sob a curva do sinal de intensidade de fluorescência em 25°C como o sinal de intensidade de fluorescência da papaína quando esta se encontra no estado nativo. A área sob a curva do sinal de intensidade de fluorescência em 70°C é considerada como da fluorescência da papaína no estado desnaturado, S_{obs} são os valores das áreas sob a curva de intensidade de fluorescência para as demais temperaturas observadas neste intervalo.

De acordo com a análise da figura 2, podemos observar que a partir de uma temperatura próxima de 54°C houve uma mudança de comportamento da curva fração desenvolvida. Podemos inferir que essa mudança de comportamento possa ser uma temperatura de pré-transição da papaína, o que os dados de correlação síncrona *sample-sample* depois ajudarão a corroborar tal informação.

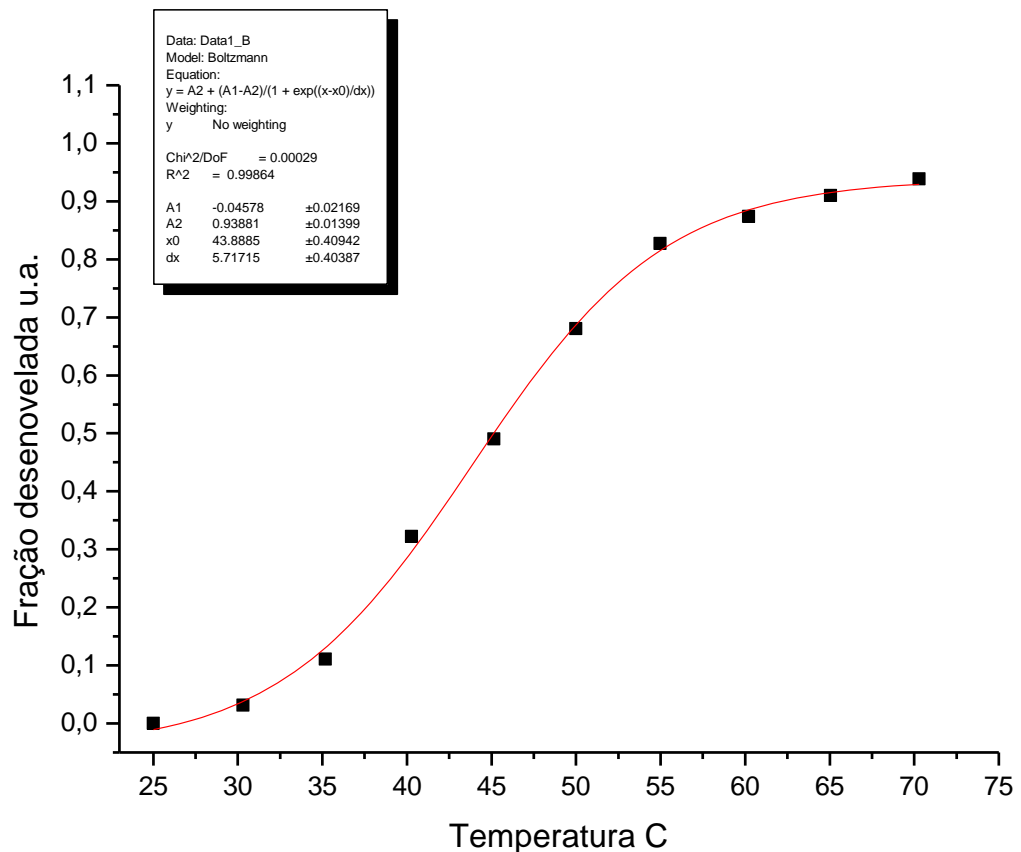


Figura 2 -Dependência da fração da papaína desenvolvida com aumento de temperatura utilizando as áreas sob a curva para obtenção da fração desenvolvida.

Para obtenção da figura 3, foi considerado o valor da intensidade de fluorescência no comprimento de onda 348 nm e em 25°C, como o sinal de intensidade de fluorescência da papaína quando esta se encontra no estado nativo, no mesmo comprimento de onda de emissão e em 70 °C foi considerado o valor de intensidade de fluorescência quando a papaína está no estado desenvolvida, S_{obs} são os valores das intensidades de fluorescência para as demais temperaturas observadas neste intervalo e no comprimento de onda de 348nm.

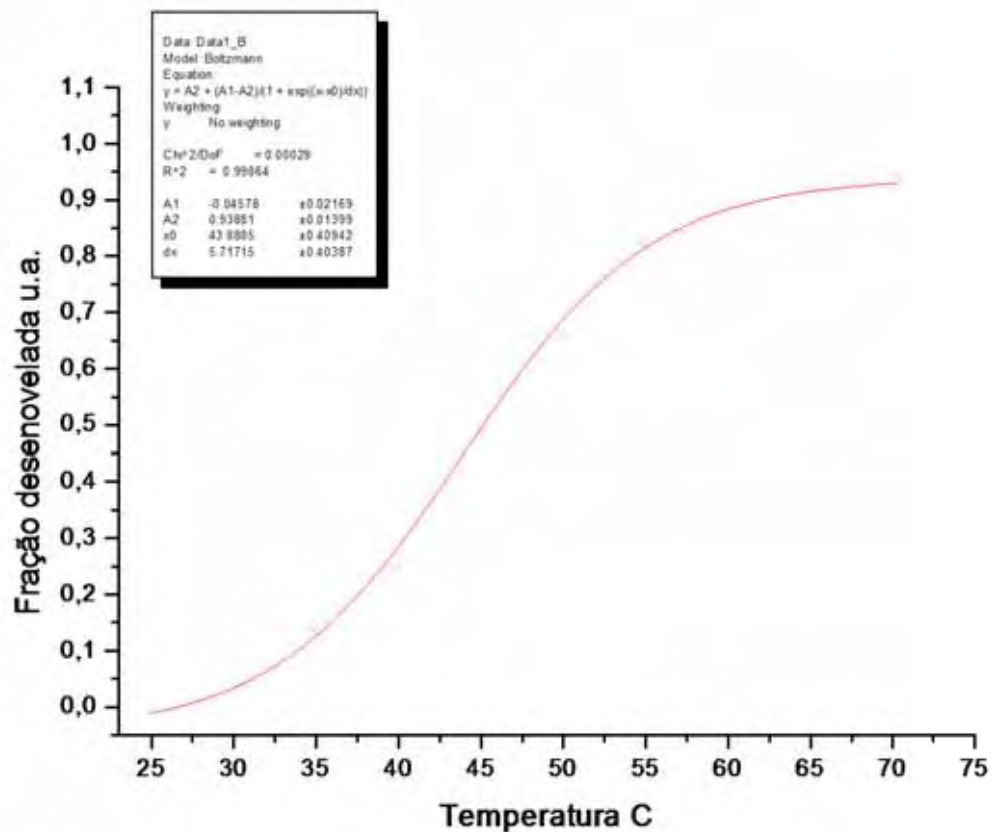


Figura 3 - Dependência da fração da papaína desenvolvida com aumento de temperatura, utilizando os valores de intensidade de fluorescência no comprimento de onda de emissão de 348nm.

As figuras, 2 e 3, também ajudam a descrever o processo de desnaturação utilizando regressão linear em dois trechos distintos da curva fração desenvolvida com temperatura, no intuito de encontrar pelo menos aproximadamente a temperatura na qual a proteína passa por uma transição e que ainda não configura o desenvolvimento.

Desta forma com a espectroscopia de fluorescência obteve-se a temperatura para um desenvolvimento parcial em 54°C e pode se ter uma idéia razoável do processo de desnaturação da papaína, cabendo a espectroscopia bidimensional no infravermelho variável variável nos fornecer a dinâmica conformacional, e a espectroscopia de correlação *sample sample* nos fornecer as demais temperaturas de pré-transição.

Cabe ressaltar que as condições criadas para obtenção dos dados de fluorescência e infravermelho são muito diferentes, já que a concentração para os espectros de fluorescência é mil vezes menor que a utilizada em infravermelho, assim a força de atração intermolecular entre proteínas é muito maior quando realizamos medidas de infravermelho, do que quando realizamos medidas de fluorescência. Outro fator importante é que a escala de energia utilizada na espectroscopia de infravermelho é suficiente somente para gerar transições vibracionais ao passo que a energia utilizada na espectroscopia de fluorescência é capaz de gerar transições eletrônicas. Dessa forma observamos que trabalhamos com técnicas que fornecem informações complementares, apesar de serem obtidas em condições muito diferentes. As medidas são realizadas dessa maneira, pois as técnicas possuem características que impossibilitam realizar o processo de medição nas mesmas condições.

8.2 Espectroscopia de correlação síncrona *Sample-Sample*

A espectroscopia de correlação síncrona *sample-sample* nos permite correlacionar a perturbação externa com as alterações na intensidade espectral e desta forma realizar um mapeamento das regiões em que ocorrem as maiores alterações na intensidade espectral influenciadas pela perturbação externa.

Este trabalho realiza a correlação da intensidade espectral de infravermelho com a variação de temperatura, e as figuras 4 a 7 mostram um corte transversal destes mapas de superfície facilitando a visualização.

A figura 4 nos mostra duas regiões distintas, que são para temperaturas inferiores e superiores a 54°C. Para temperaturas inferiores a 54°C podemos observar que tivemos algumas alterações na intensidade de correlação, mas essas alterações não são tão intensas quanto após 54°C, observamos que as alterações na intensidade espectral ocorreram mais significativamente após os 54°C e, conseqüentemente as mudanças conformacionais devem acompanhar esse efeito. Resultado esse que se encontra de acordo com os obtidos pela espectroscopia de fluorescência.

Como as maiores variações na intensidade espectral ocorreram acima dos 54°C, se tivéssemos outras temperaturas de pré-transição, para temperaturas maiores ou menores que 54°C essas não seriam percebidas pelos espectros síncronos *sample sample*. Sendo assim foi realizada a análise para temperaturas superiores e inferiores a 54°C.

As figuras 5 e 6 correspondem ao espectro de correlação síncrona *sample-sample* para o intervalo de temperatura inferior a 54°C. O intervalo entre 25°C e 54°C foi dividido em duas partes, pois é um intervalo longo de temperaturas, podendo ocorrer de alguma temperatura de pré-transição não ser evidenciada nesse intervalo. De acordo com a figura 5, podemos observar que próximo a temperatura de 34°C, ocorre uma pré-transição da papaína, e esta temperatura está de acordo com o trabalho de Edin e Jagannadham (1998), que a obteve através de uma técnica espectroscópica distinta.

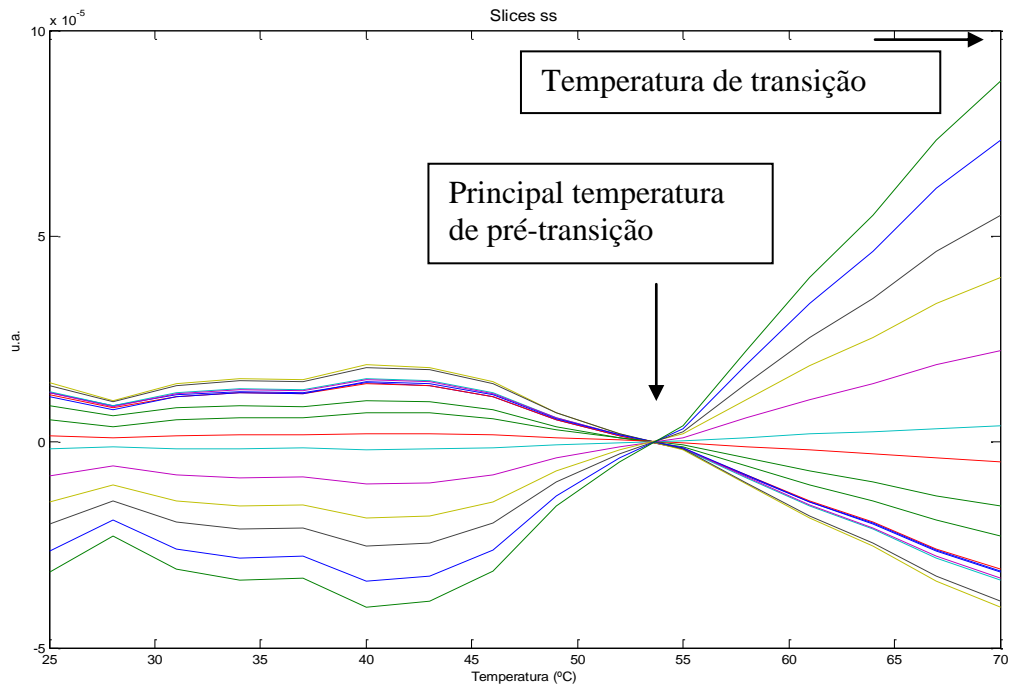


Figura 4 - Corte do gráfico *sample sample*, determinação da principal temperatura de pré-transição.

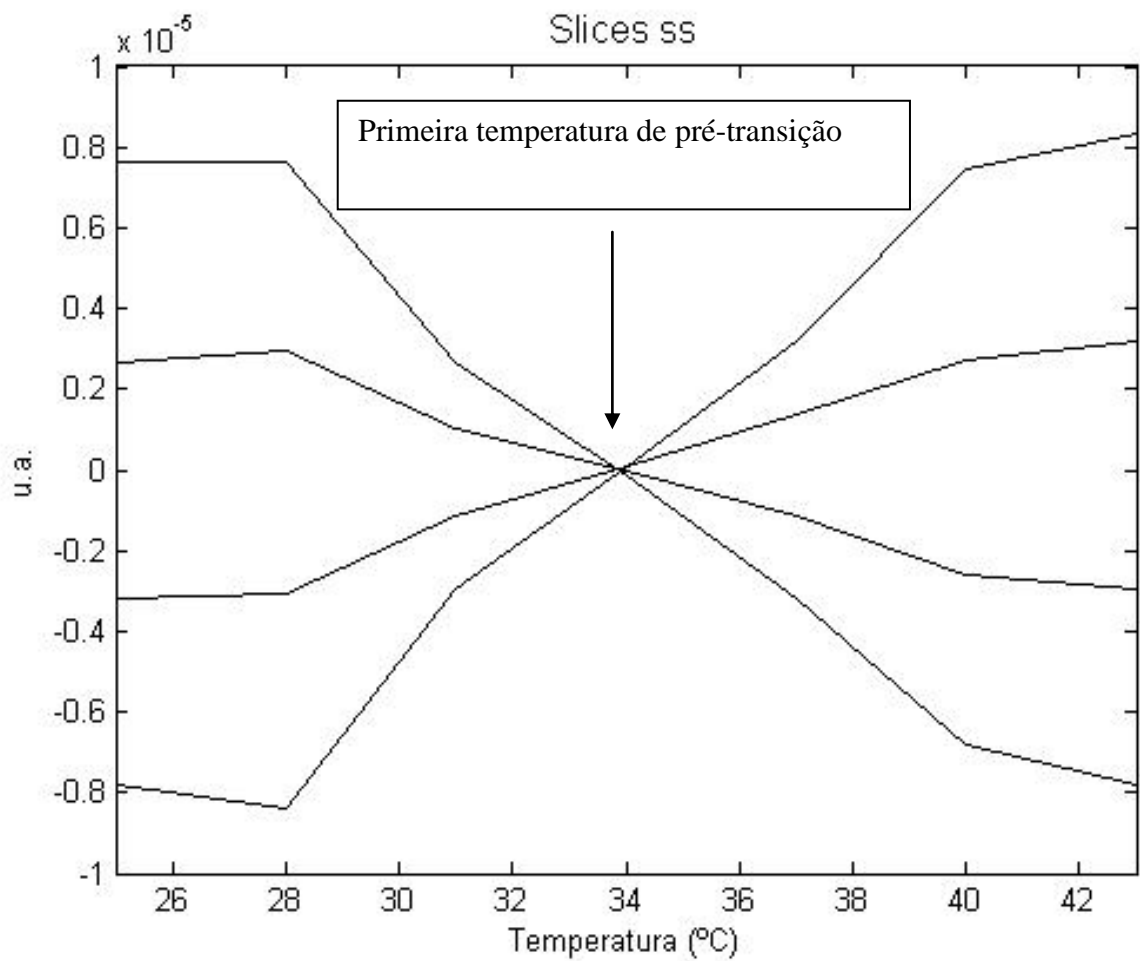


Figura 5 - Corte do espectro de correlação *sample sample* e determinação da primeira temperatura de pré-transição da papáina.

A figura 6 corresponde à análise realizada para o intervalo de 43°C a 52°C, e como observado para essa faixa de temperatura não ficou evidenciada outra temperatura de pré-transição. Dessa forma podemos observar que para o intervalo de temperatura inferior a 54°C temos somente uma temperatura de pré-transição em 34°C.

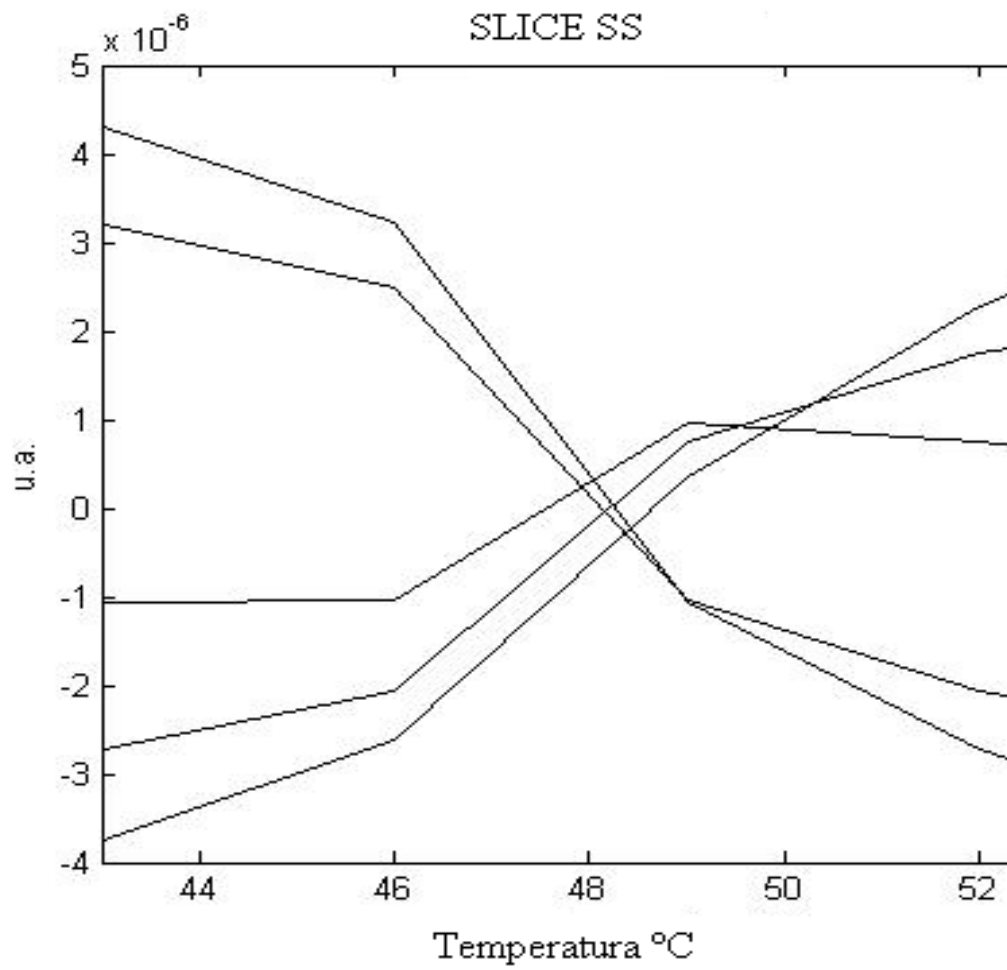


Figura 6 - Corte do espectro de correlação *sample sample*, nenhuma temperatura de pré-transição evidenciada.

A figura 7 corresponde ao espectro de correlação síncrona *sample-sample* para o intervalo de temperatura superior a 54°C.

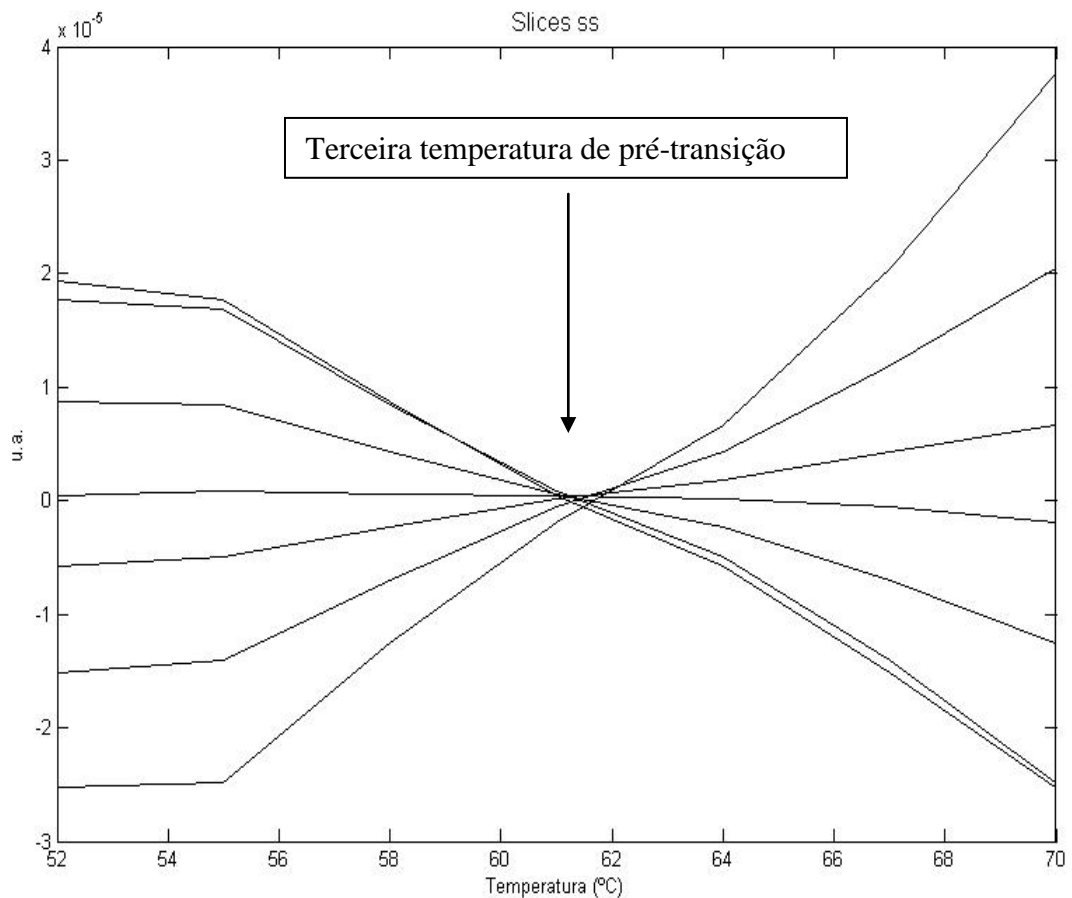


Figura 7: Corte do espectro de correlação *sample-sample* e determinação da terceira temperatura de pré-transição da papaína.

De acordo com esta figura podemos observar que próximo a temperatura de 61°C, temos a terceira temperatura de pré-transição da papaína, temperatura esta que até o momento não foi descrita na literatura. Dessa forma com os espectros de correlação síncrona *sample-sample* conseguiu-se obter duas temperaturas de pré-transição da papaína em todo intervalo de temperatura que são corroboradas por outras técnicas espectroscópicas e estão abaixo inclusive da maior pré-transição conformacional, e obtivemos uma terceira temperatura de pré-transição acima de 54°C. Cabe agora aos espectros de correlação 2D-IR variável-variável descrever com mais precisão e detalhamento informações sobre mudanças conformacionais ocorridas na estrutura secundária da papaína.

8.3 Espectroscopia de correlação bidimensional variável variável 2D IR

O espectro de correlação 2D síncrono representa mudanças na intensidade espectrais simultâneas ou coincidentes, e é constituído por auto-picos (presentes na diagonal principal), cuja intensidade reflete as regiões do espectro que tem maior correlação sob efeito da perturbação externa. Os picos cruzados (localizados fora da diagonal), descrevem as mudanças de intensidade espectral entre duas variáveis espectrais diferentes ν_1 e ν_2 . Com o espectro de correlação síncrona conseguimos observar quais as regiões espectrais que foram afetadas pelo processo de perturbação e, além disso, se as alterações ocorreram na mesma direção ou se ocorreram em direções opostas. Em um espectro 2D síncrono, picos cruzados negativos indicam que as mudanças de intensidade observadas em duas coordenadas espectrais ocorrem em anti-similaridade, isto é, estão fora de fase, implicando que uma variável antecipa a outra. Um pico cruzado positivo, por outro lado, indica que as mudanças de intensidade estão ocorrendo similarmente, isto é, ambas as variáveis respondem em conjunto ao estímulo externo.(NODA, 1990).

O espectro de correlação 2D assíncrono informa sobre as respostas espectrais que ocorrem fora de fase com a perturbação externa. Ou seja, o espectro assíncrono positivo revela se a alteração na intensidade espectral ocorre predominantemente em ν_1 antes de ν_2 , e se o espectro assíncrono for negativo temos a alteração na intensidade espectral em ν_2 antecipando ν_1 . Desta forma conseguimos mapear a sequência de eventos que ocorrem na amostra durante todo o processo de perturbação.

A figura 8 mostra a presença de auto-picos em 1632, 1652, 1685 e 1695 cm^{-1} .

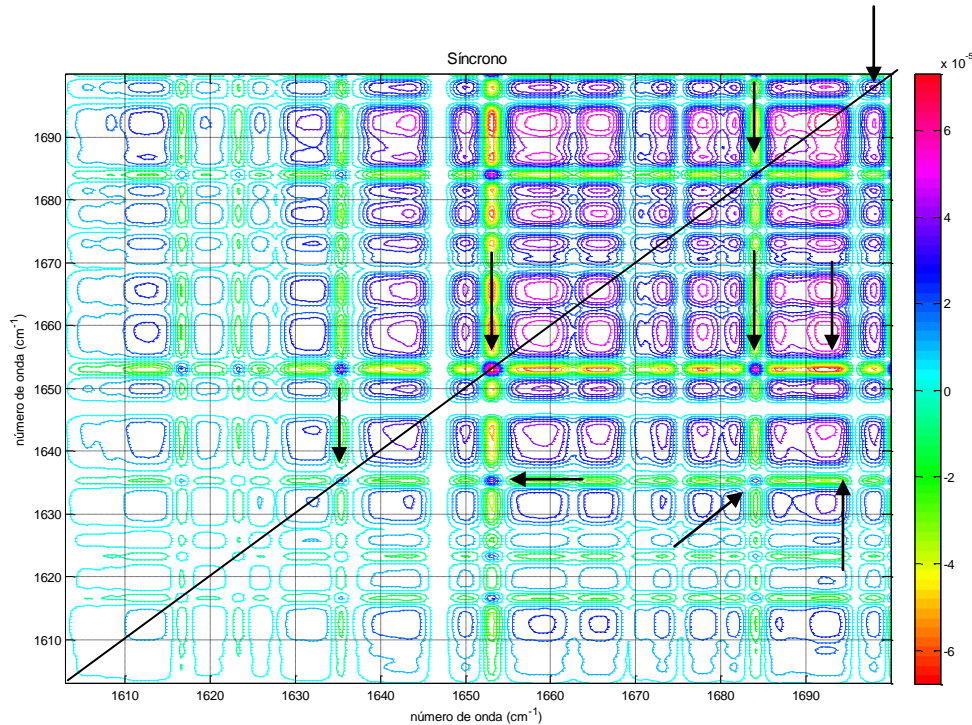


Figura 8 - Espectro de correlação síncrona de 25° a 70°C para papaína. As setas indicam os autopicos na linha diagonal e os picos cruzados localizados fora dela.

Estes autopicos podem ser atribuídos às estruturas de folha β , hélice α , folha beta antiparalela e voltas, respectivamente. Esses autopicos mostram as estruturas que mais sofreram mudanças conformacionais durante o processo de perturbação externa.

Ainda com relação à figura 8, fazendo a análise dos picos cruzados podemos observar que quando comparamos os picos cruzados em 1652 e 1635 cm^{-1} ou 1652 e 1685 cm^{-1} obtemos picos cruzados positivos indicando que as mudanças conformacionais ocorridas nessas estruturas ocorreram simultaneamente, ao passo que quando comparamos 1695 com 1635 ou 1652 cm^{-1} observamos que as mudanças conformacionais ocorreram fora de fase. Dessa forma podemos observar que as mudanças conformacionais ocorridas nas hélices α , folhas β e folhas β antiparalelas ocorreram em fase ao passo que as voltas ocorreram de forma não sincronizada.

De acordo com a figura 9, quando comparamos o pico cruzado em 1652 cm^{-1} com os que ocorrem em 1610, e 1625 cm^{-1} , respectivamente, observamos que os picos cruzados são; negativo, positivo, revelando que a presença do contato intercadeias laterais, 1610 cm^{-1} ,

ocorreu antecipando mudanças conformacionais nas hélices 1652 cm^{-1} , e que as mudanças conformacionais nas hélices ocorreram predominantemente antes da presença do contato intercadeias de folha β , 1625 cm^{-1} . Quando comparamos os picos cruzados em 1685 cm^{-1} que corresponde à folha β antiparalela com os que ocorrem em 1610 , 1642 e 1665 cm^{-1} , observamos que são negativos, indicando que as mudanças conformacionais nas folhas β antiparalelas são antecipadas pelas mudanças conformacionais ocorridas nas estruturas desordenadas, 1642 cm^{-1} , pelo contato intercadeias, 1610 cm^{-1} e pelas voltas 1665 cm^{-1} . Quando comparamos o pico cruzado em 1685 cm^{-1} com a presença de contato intercadeias de folha β 1625 cm^{-1} , observamos que o pico cruzado é positivo, indicando que as mudanças conformacionais na folha β antiparalela ocorreram predominantemente antes que a presença do contato intercadeias laterais de folha β .

Dessa forma podemos ter a informação da sequência de eventos ocorridos durante o processo de desenovelamento da papaína.

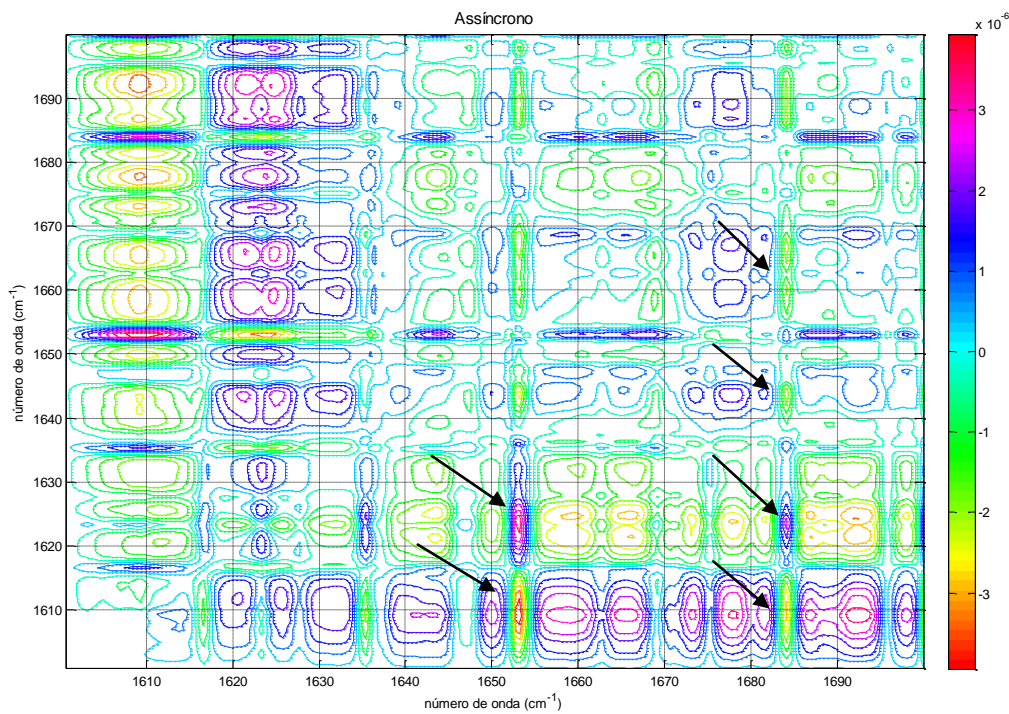


Figura 9 - Espectro de correlação 2D-IR assíncrono, medida realizada no intervalo de temperatura que se estende de 25° a 70°C .

Estes primeiros dados da espectroscopia de infravermelho analisados são referentes a todo o intervalo de perturbação sofrido pela papaína, ou seja, de 25° a 70°C . Para uma melhor

análise, dividiu-se em três intervalos todo o processo de desenovelamento da papaína: um que abrange 25 a 43°C, outro de 43 a 52°C e outro de 52 a 70°C, de modo a mapear o processo de desenovelamento da papaína e analisar o comportamento comparando o intervalo inferior e superior a 54°C, que corresponde ao primeiro ponto de transição.

A figura 10 nos mostra o comportamento das estruturas secundárias da papaína no intervalo de temperatura que se estende de 25 a 43°C.

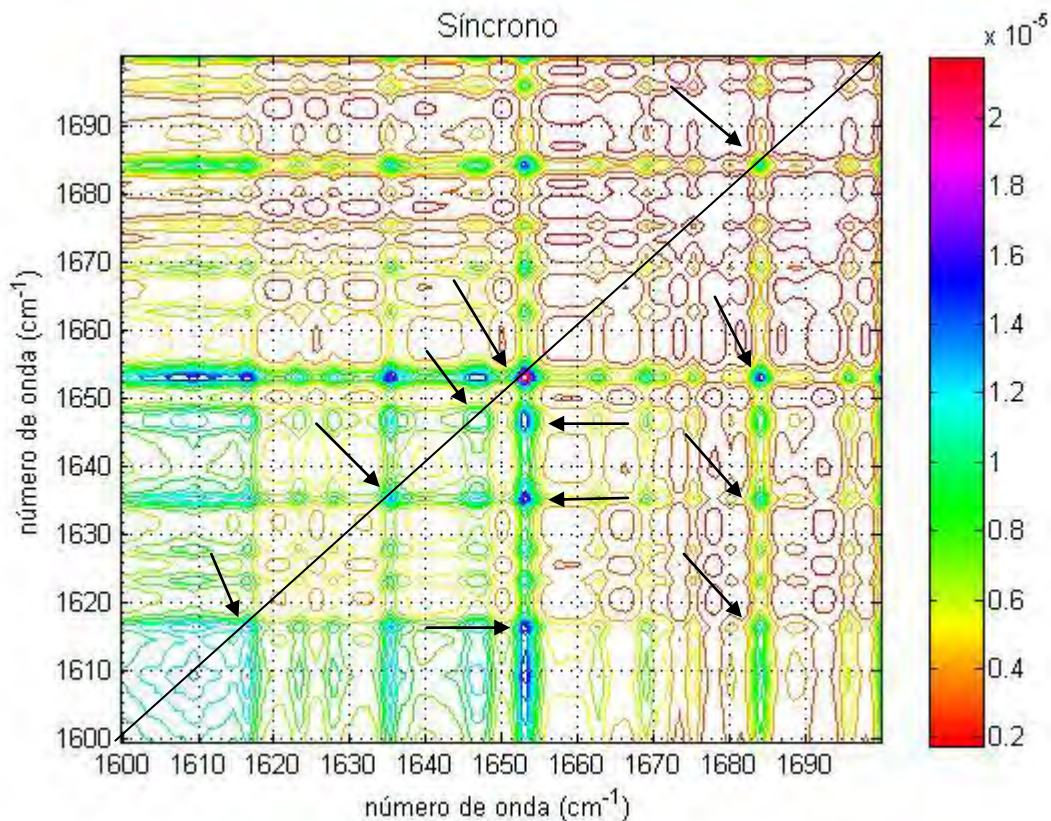


Figura 10- Espectro de correlação sincrona utilizando o intervalo de temperatura de 25° a 43°C. As setas na diagonal principal indicam os autopicos e as setas localizadas fora dela os picos cruzados.

De acordo com a figura 10 podemos observar os autopicos, presentes na linha diagonal, localizados em; 1615, 1632, 1645, 1652 e 1685 cm⁻¹, respectivamente. Estes números de onda correspondem respectivamente ao contato intercadeias laterais, folha β , aleatório, α - hélice e folha β antiparalela, que foram as estruturas que mais sofreram mudanças conformacionais nesse intervalo de temperatura.

Ainda com relação à figura 10, quando se realiza a análise dos picos cruzados, observamos que todos os autopicos são positivos, revelando que as mudanças conformacionais neste intervalo de temperatura ocorrem em fase.

A figura 11, que corresponde ao espectro de correlação assíncrona no intervalo de temperatura de 25 a 43°C, nos mostra que em 1652 e 1685 cm^{-1} as variações ocorreram de forma muito semelhante. Dessa forma podemos dizer que nesse intervalo de temperatura as mudanças conformacionais sofridas pelas hélices- α e folhas β antiparalelas ocorreram praticamente juntas. Juntando as informações das figuras 10 e 11, observamos que as mudanças conformacionais neste intervalo de temperatura se distribuíram em todas as estruturas secundárias da papaína, dessa forma a energia térmica fornecida distribui em todas as estruturas secundárias, de forma a gerar mudanças conformacionais ou aumentar a amplitude dos modos de vibração, o que acaba por conferir uma estabilidade maior à proteína com relação ao estímulo externo.

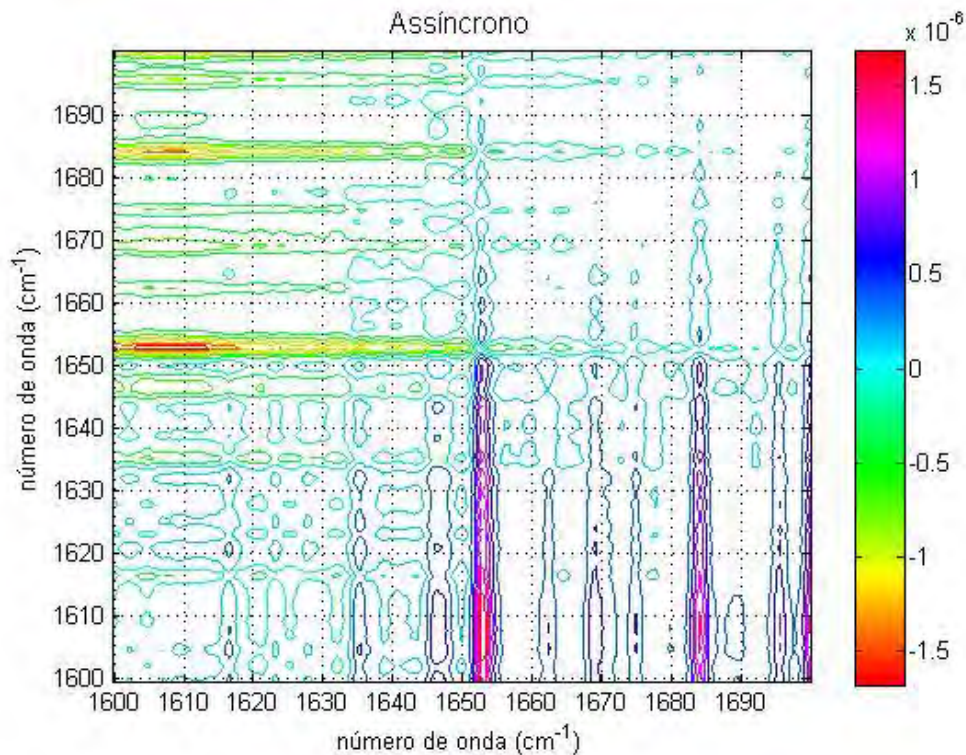


Figura 11 - Espectro de correlação assíncrona no intervalo de temperatura de 25 a 43°C.

A figura 12 nos mostra a sequência de perturbações externas das estruturas secundárias da papaína no intervalo de temperatura que se estende de 43° a 52°C.

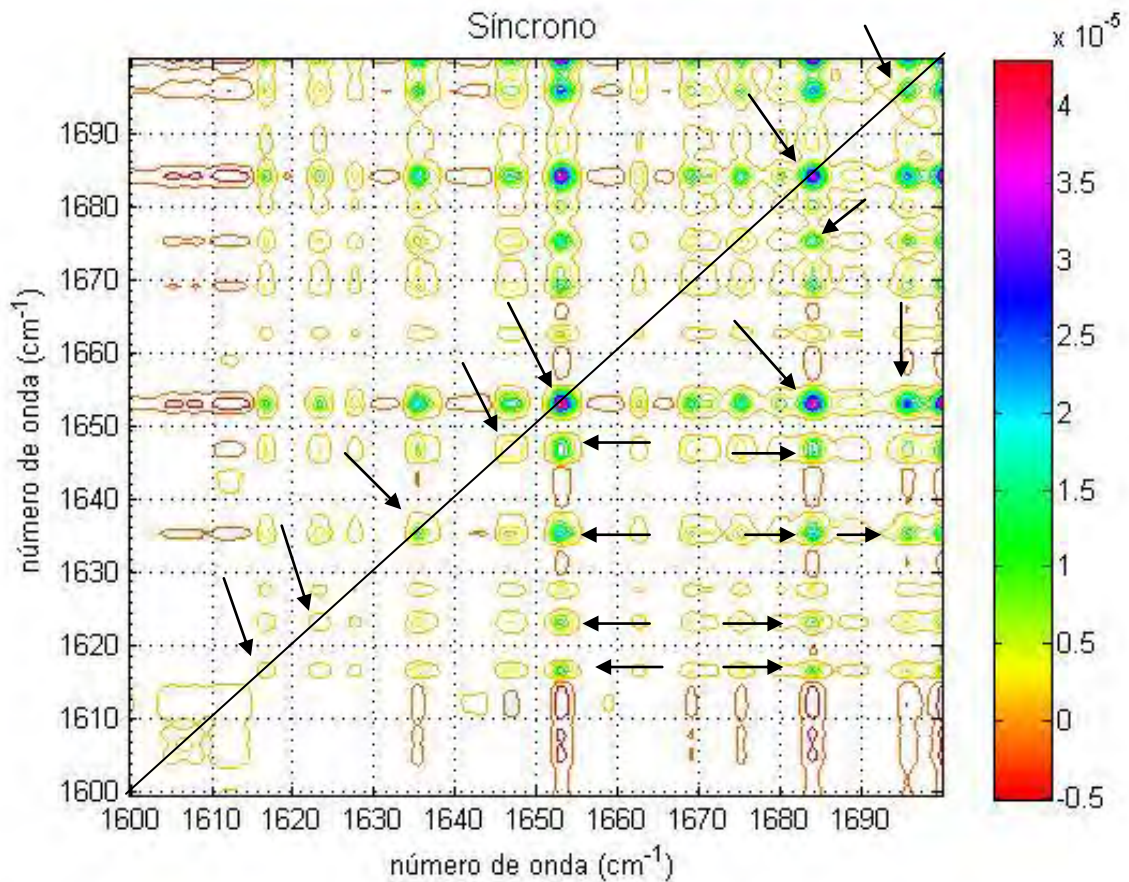


Figura 12- Espectro de correlação assíncrona no intervalo de temperatura de 43° a 52°C

De acordo com a figura 12 podemos observar que os autopicos ocorrem em 1615, 1625, 1632, 1645, 1652, 1685, 1695 cm^{-1} , respectivamente. Estes autopicos correspondem as estruturas de contato intercadeias laterais, contato intercadeias laterais de folha β , folha β , voltas, α hélice, folha β antiparalela e voltas, respectivamente. Estes autopicos mostram que estas foram as estruturas que mais sofreram mudanças conformacionais devido a perturbação externa. Observa-se que na figura 10 não ficavam evidenciados os autopicos em 1625 e 1695 cm^{-1} , e ficam evidentes na figura 12. Essa informação nos dá o indício que no intervalo de 43 a 52°C a papaína começa a possuir contato intercadeias de folha β e que as estruturas aleatórias passam a sofrer mudanças conformacionais mais acentuadamente.

Ainda com relação à figura 12, quando se realiza a análise dos picos cruzados, observamos que todos os autopicos são positivos, revelando que as mudanças conformacionais nesse intervalo de temperatura ocorrem em fase, comportando-se como ocorre no intervalo de 25° a 43 °C.

A figura 13, que corresponde à correlação assíncrona no intervalo de temperatura de 43° a 52°C, nos mostra que em 1652 e 1685 cm^{-1} as variações ocorreram de forma muito semelhante. Dessa forma podemos dizer que nesse intervalo de temperatura, assim como no intervalo de 25° a 43°C, as mudanças conformacionais sofridas pelas hélices- α e folhas β antiparalelas ocorreram praticamente juntas.

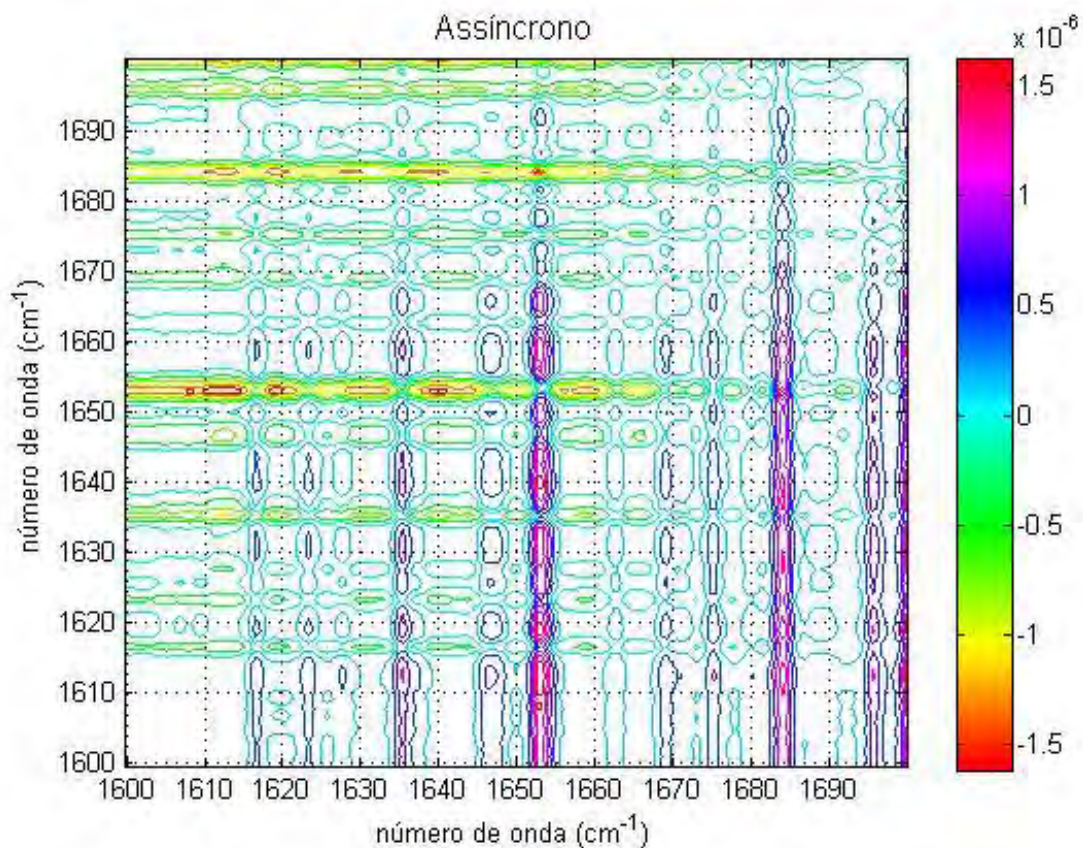


Figura 13 - Espectro de correlação assíncrona no intervalo de temperatura de 43° a 52°C.

Juntando as informações advindas das figuras 12 e 13, observamos que as mudanças conformacionais nesse intervalo de temperatura se distribuíram em todas as estruturas secundárias da papaína, dessa forma a energia térmica fornecida distribui em todas as estruturas secundárias da papaína, o que acaba por conferir uma estabilidade maior à proteína

com relação ao estímulo externo. Resultado análogo ao obtido no intervalo inferior de temperatura.

A figura 14 corresponde ao espectro de correlação síncrona no intervalo de temperatura que estende se de 52° a 70°C.

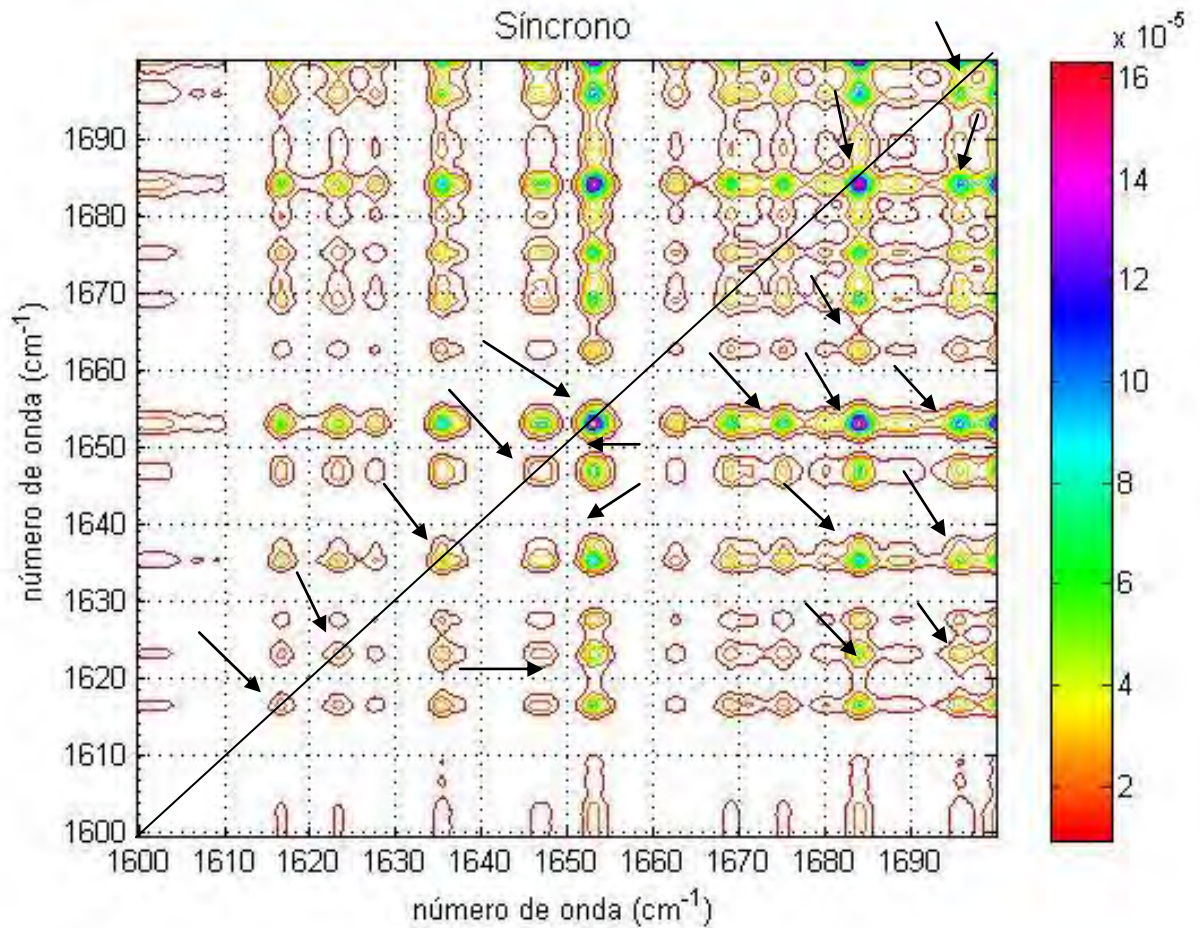


Figura 14- Espectro de correlação síncrona utilizando o intervalo de temperatura de 52° a 70° C.

De acordo com a figura 14 podemos observar que os autopicos ocorrem em 1615, 1625, 1632, 1645, 1652, 1685, 1695 cm^{-1} , respectivamente. Estes autopicos correspondem às estruturas de contato intercadeias laterais, contato intercadeias laterais de folha β , folha β , voltas, α hélice, folha β antiparalela e coil, respectivamente. Estes autopicos mostram que estas foram as estruturas que mais sofreram mudanças conformacionais devido a perturbação externa.

Ainda com relação à figura 14, quando se realiza a análise dos picos cruzados, observamos que todos os autopicos são positivos, revelando que as mudanças conformacionais neste intervalo de temperatura, ocorreram similarmente ao observado nos outros intervalos de temperatura.

A figura 15, que corresponde à correlação assíncrona no intervalo de temperatura de 52° a 70°C, de forma análoga às figuras 11 e 13, nos mostra que em 1652 e 1685 cm^{-1} as variações ocorreram de forma muito semelhante. Dessa forma podemos dizer que nesse intervalo de temperatura, assim como no intervalo de 25° a 43°C, e no intervalo de 43° a 52°C, as mudanças conformacionais sofridas pelas hélices- α e folhas β antiparalelas ocorreram praticamente juntas.

Juntando as informações advindas das figuras 14 e 15, observamos que as mudanças conformacionais neste intervalo de temperatura se distribuíram em todas as estruturas secundárias da papaína, dessa forma a energia térmica fornecida distribui em todas as estruturas secundárias da papaína, o que acaba por conferir uma estabilidade maior à proteína com relação ao estímulo externo. Resultado análogo aos obtidos nos intervalos inferiores de temperatura.

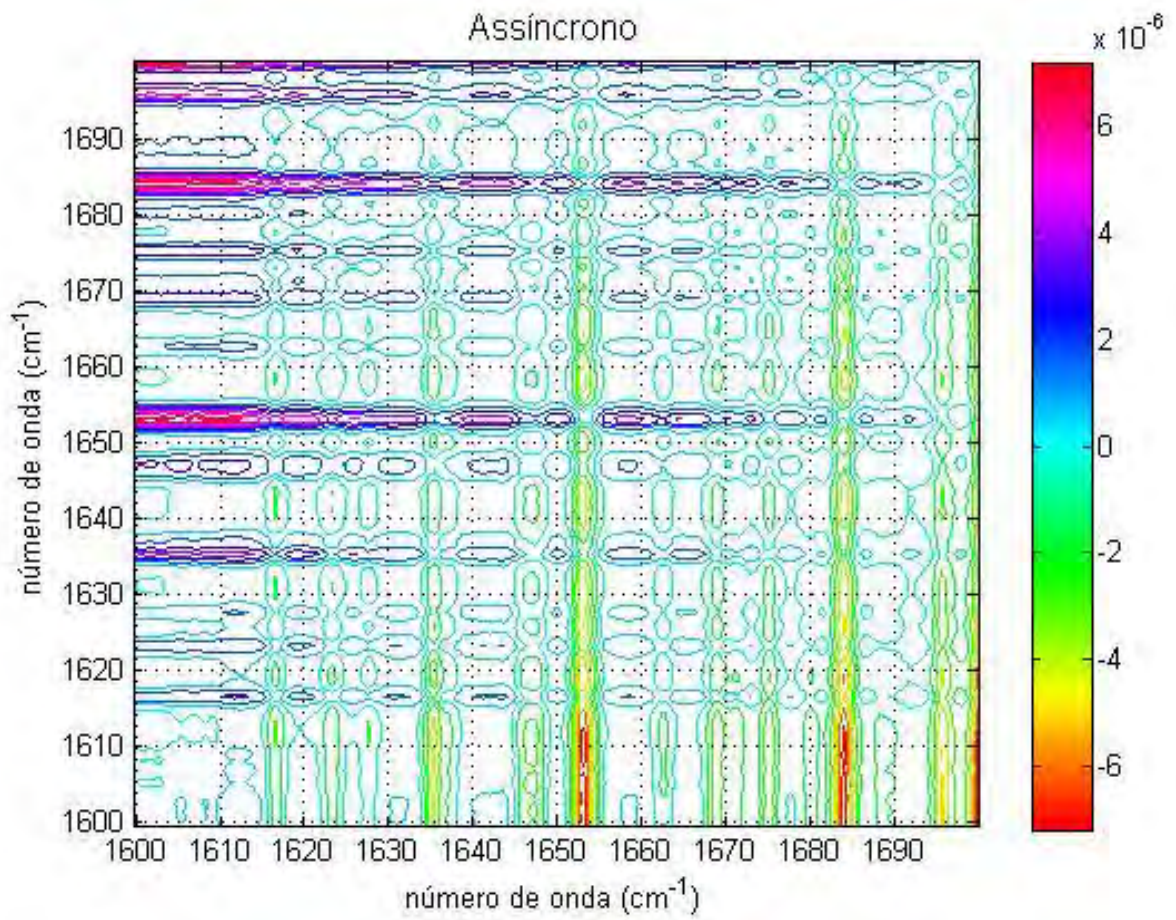


Figura 15 - Espectro de correlação assíncrona utilizando o intervalo de temperatura que se estende de 52° a 70°C.

9 CONCLUSÃO

Podemos observar que a técnica espectroscópica de fluorescência com variação de temperatura nos dá uma idéia do processo de desenovelamento proteico. Com esta técnica observamos que um aumento de temperatura gera mudanças conformacionais na proteína e, além disso, torna possível encontrar as frações desenoveladas com o aumento de temperatura.

Com os dados de fluorescência se conseguiu obter o primeiro ponto de pré-transição em 54°C, que é uma temperatura que ainda não configura o desenovelamento, que ocorre em 70°C.

Com a espectroscopia de correlação bidimensional *sample sample*, se consegue observar a influência da perturbação externa na proteína, informação que em um espectro unidimensional de infravermelho não se torna possível. Neste trabalho consegue-se mapear as temperaturas de pré-transição, de forma a dar informações de a partir de quais temperaturas o desenovelamento proteico fica mais acentuado, dentro de um intervalo de temperatura fixado. Mostrando dessa forma em que temperaturas estão os embriões de desenovelamento, regiões a partir das quais as vibrações moleculares ficam com uma amplitude maior, capaz de gerar inclusive o desenovelamento de algumas estruturas. Consegue inclusive mapear temperaturas que ficam imperceptíveis para outras técnicas.

Neste trabalho para realização da análise *sample sample*, primeiro se estudou todo o intervalo de temperatura, 25° a 70°C, de forma a obter o principal ponto de pré-transição que ocorre em 54°C, dado esse que é corroborado pelo trabalho de Edwin e Jagannadham (1998), e que os dados de fluorescência presentes nesse trabalho ajudam a corroborar essa informação.

De acordo com os espectros observamos que no intervalo de 25° a 43°C, temos uma temperatura de pré-transição que ocorre próximo aos 34°C, dado esse que se encontra na literatura, Edwine Jagannadham (1998), sendo obtido por outra técnica espectroscópica. No intervalo de 43° a 52°C, nenhuma temperatura de pré-transição pode ser observada como está mostrado na figura 6. No intervalo de temperatura superior ao primeiro ponto de transição,

54°C, foi possível observar mais uma temperatura de pré- transição que ocorre próximo de 61°C, temperatura essa que até o momento não consta na literatura.

Assim podemos com o auxílio da espectroscopia de correlação sample sample mapear temperaturas anteriores à temperatura de desenovelamento que são corroboradas por outras técnicas espectroscópicas, e além disso conseguimos evidenciar através dessa técnica uma terceira temperatura de pré-transição, 61°C, que ainda não havia sido evidenciada por outras técnicas espectroscópicas, mostrando grande potencial dessa técnica.

Com o auxílio da técnica espectroscópica variável variável, é realizado um estudo da dinâmica conformacional coletando informações dos espectros síncronos e assíncronos. Primeiro realizou-se uma análise levando em conta todo o intervalo de temperatura, 25° a 70°C, e de acordo com o espectro síncrono, pode se observar que todas as estruturas, com exceção das voltas, se desenovelaram em fase. Com o espectro assíncrono, para toda a faixa de temperatura, conseguimos ver a evidencia de contato intercadeias laterais, (1615 cm^{-1}), antes do desenovelamento das α hélices, (1652 cm^{-1}), e das folhas β antiparalelas (1685 cm^{-1}), e que as estruturas de voltas e aleatórias desenovelaram antes das estruturas de folha β antiparalela. De acordo com os dados para os intervalos de temperatura de 25° a 43°C, de 43° a 52°C e de 52° a 70°C, que são os mesmos utilizados na análise sample sample, observamos que os espectros síncronos, para os três intervalos de temperatura, possuem somente picos cruzados positivos, dessa forma dizemos que as estruturas da papaína sofreram mudanças conformacionais em fase, e que a energia térmica fornecida distribui em todas as estruturas secundárias da papaína o que acaba por conferir à proteína uma estabilidade maior com relação ao estímulo externo, fazendo com que a energia térmica distribua em todas as estruturas, de forma a aumentar a amplitude de vibração molecular.

Além disso, observamos que os autopicos estão localizados em 1615, 1632, 1645, 1652, 1685 cm^{-1} , que correspondem ao contato intercadeias laterais, folha β , voltas, α hélice e folha β antiparalela, respectivamente. Esses autopicos aparecem em todos os intervalos de temperatura analisados, revelando dessa forma as estruturas que mais sofreram mudanças conformacionais a partir de um estímulo externo. A partir de 43°C observa-se também um sinal em 1625, que corresponde ao contato intercadeias laterais de folha β , e um sinal em 1695, que corresponde às voltas, revelando dessa forma que após atingidos os 43°C, começa a

ter evidência do contato intercadeias laterais de folha β e as voltas começam também a sofrer mudanças conformacionais mais acentuadamente.

As figuras 9, 11 e 13, que correspondem aos espectros de correlação assíncronas, nos intervalos de temperatura de 25° a 43°C, 43° a 52°C e 52° a 70°C nos mostram que em 1652 e 1685 cm^{-1} as variações ocorreram de forma muito semelhante. Dessa forma podemos dizer que nesses intervalos de temperatura as mudanças conformacionais sofridas pelas hélices- α e folhas β antiparalelas ocorreram praticamente juntas, informação essa que está de acordo com as obtidas pelos espectros síncronos, que indicam que as mudanças conformacionais ocorrem em fase.

Dessa forma os espectros de correlação variável variável nos mostram uma similaridade no comportamento, nos indicando que o enovelamento da papaína ocorre em fase e em todos os intervalos de temperatura analisados, seja para a análise em todo intervalo de temperatura, 25° a 70°C, ou nos intervalos de 25° a 43°C, 43° a 52°C e 52° a 70°C. A única diferença é que quando analisamos o intervalo de temperatura que estende-se de 25° a 70°C, observamos que as estruturas de voltas e aleatórias desenovelam se fora de fase, antecipando o desenovelamento das hélices α , folhas β e folhas β antiparalelas. Cabe ressaltar que é um comportamento comum, tendo em vista que as voltas e estruturas aleatórias são menos estáveis energeticamente que as estruturas de hélices α , folhas β e folhas β antiparalelas, e dessa forma são mais facilmente perturbadas.

Assim a espectroscopia de correlação variável variável se mostra se uma técnica muito poderosa para proposição da dinâmica conformacional, conseguindo analisar a sequência de mudanças conformacionais ocorridas no processo de desenovelamento, mesmo realizando a análise com um conjunto de dados que não são resolvidos no tempo. Consegue-se ver as mais sutis mudanças conformacionais sofridas pela proteína, informações que são de difícil obtenção com outras técnicas espectroscópicas.

Se fizermos uma comparação entre as figuras 9, 11 e 13, espectros assíncronos para os intervalos de temperatura de 25° a 43°C, 43° a 52°C e 52° a 70°C, respectivamente, notaremos que quanto maior a temperatura, mais o espectro se torna correlacionado. Isso pode ser interpretado que com o aumento da temperatura, a proteína ganha maior número de

modos vibracionais, além de amplificar os já existentes, dessa forma ganha em entropia conformacional e os espectros ficam mais correlacionados.

Dessa forma, conseguimos nesse trabalho mapear a principal temperatura de pré-transição da papaína em duas técnicas distintas, 54°C; mapeamos, além dessa temperatura, mais duas temperaturas de pré-transição, 34°C e 61°C, sendo a de 34°C corroborada por trabalhos presentes na literatura e a temperatura de pré-transição em 61°C, que até o momento não havia sido evidenciada, além ter uma análise da dinâmica no processo de desenovelamento da papaína e esta nos revelando que as modificações na estrutura secundária da papaína ocorrem em fase; as mudanças conformacionais se distribuem em todas as estruturas secundárias presentes na papaína. Nesse trabalho também foi realizada a complementação das informações com o auxílio das técnicas espectroscópicas de correlação *sample sample* e variável variável, que em muitos trabalhos geralmente aparecem ou uma ou outra forma de análise de dados.

10 REFERÊNCIAS

- ANFINSEN, C. B. et al. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.47, p. 1309-1314, 1961.
- ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, Washington, v. 181, n. 96, p. 223- 230, 1973.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics**. Amsterdam, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.
- BARRET, G. C., ELMORE, D.T. **Amino acids and peptides**. Cambridge: Cambridge University, 1998.
- BREDENBECK, J.; HAMM P. Transient 2D-IR spectroscopy. **Journal. Chem. Phys.** Washington, v.119, p. 1569, 2003.
- BUCHNER, J., KIEFHABER, T. Protein folding handbook. Verlag: Wiley, 2005. v. 1.
- EDWIN, F.; JAGANNADHAM, M. V. Sequential unfolding of papain in molten globule state. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 252, n. 3, p. 654-660, 1998.
- FILOSA, A. et al. Two dimensional infrared correlation spectroscopy as a probe of sequential events in the thermal unfolding of cytochromes c. **Biochemistry**, v. 40, n. 28, p. 8256-63, 2001.
- GOORMAGHTIGH, E.; CABIAUX, V.; RUYSSCHAERT, J. M. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Secondary structures, Subcellular. **Biochemistry**, v. 23, p. 405–450 1994.
- IMAGEM funil energético, teoria do Landscape. Disponível em: <<http://qaonline.iqsc.usp.br>> Acesso em: 23 maio 2008.
- JUNG, Y. M.; CZARNIK-MATUSEWICZ, B.; OZAKI, Y. Progress in two-dimensional correlation spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry. B. Materials, surfaces, interfaces and biophysical**. v. 104, p. 7812, 2000.
- KUMAR, T. K.; YU, C. Monitoring protein folding at atomic resolution. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 37, p. 929-936, 2004.
- KUWAJIMA, K. et al. Three-state denaturation of β -lactalbumin by guanidine hydrochloride. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 106, p. 359-373, 1976.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. p. 145-149.

LEVINTHAL, C. Are there pathways for protein folding? **Journal de Chimie Physique**, Paris, v. 65, p. 44- 45, 1968.

LOWE, G. The cysteine proteinases. **Tetrahedron**, Oxford, v. 32, p. 291-302, 1976.

MÉNARD, R. Structure-function studies in the papain family of cysteine proteases. **Ciência e Cultura. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, Sao Paulo, v. 45, n. 5, p. 292-298, 1993.

NODA, I.; OZAKI, Y, **Two-dimensional correlation spectroscopy-applications in vibrational and optical spectroscopy**. New York: Jonh Wiley & Sons, 2004. p.1-74

NODA, I. Two-dimensional infrared (2D IR) spectroscopy: theory and applications. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v. 44, n. 4, p. 550, 1990.

OHGUSHI, M., WADA, A. Molten-globule state: a compact form of globular proteins with mobile side-chains. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 164, p.21-24, 1983.

OZAKI, Y.et al. Two-dimensional near-infrared correlation spectroscopy studies of compatible polymer blends: composition-dependent spectral variations of blends of atactic polystyrene and poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene ether). **Spectroscopy Letters: an International Journal for Rapid Communication**, New York, v. 17, p. 79, 2003.

PAQUET, M. J.et al. Two-dimensional Infrared correlation spectroscopy study of the aggregation of cytochrome *c* in the presence of dimyristoylphosphatidylglycerol. **Biophysical Journal**, New York, v. 81, n. 305, 2001.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. , Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SKOOG, D. A. HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.**Princípios de análise instrumental**. Tradução de Ignez Caracelli. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002

SMELLER, L. Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1595, p. 11-29, 2002.

IMAGEM funil energético, teoria do Landscape; Disponível em: <<http://qaonline.iqsc.usp.br>>
Data de acesso: 22 maio 2008.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, New York, v. 24, p. 1-67, 1970.

TORRECILLAS, A.; CORBALAN-GARCIA, S.; GOMEZ-FERNANDEZ, J. C. An infrared spectroscopic study of the secondary structure of protein kinase C α and its thermal denaturation . **Biochemistry**, Washington, v. 42, p. 11669, 2003.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2. ed. New York: Jonh Wiley & Sons, 1995.

YAN, Y. B. et al. Two-dimensional infrared correlation spectroscopy study of sequential events in the heat-induced unfolding and aggregation process of myoglobin. **Biophysical Journal**, New York, v. 85, p. 1959, 2003.

Wu, Y. Q. Two-dimensional/ATR infrared correlation spectroscopic study on water diffusion in a poly(ϵ -caprolactone) matrix. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v. 56, p. 1186, 2002.