

Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
Disciplina de Bioinformática

DICROISMO CIRCULAR

Iara Pinto

Simone Rodrigues

Dicroísmo Circular (CD)

A ligação peptídica absorve radiação na região UV, mais precisamente em comprimentos de onda entre 1800 e 2300 Å.

Essa forma de estruturação da cadeia proteica origina a chamada "**estrutura secundária**" da proteína, que pode então assumir arranjos helicoidais em determinados trechos de sua sequência de aminoácidos.

Dicroísmo Circular (CD)

Essas formas interagem de modo particular com a radiação polarizada, fazendo, por exemplo, com que uma luz com polarização circular no sentido horário seja absorvida diferentemente do que uma luz com polarização no sentido anti-horário.

A espectroscopia de **dicroísmo circular** mede justamente essa diferença e permite verificar se estão ocorrendo arranjos helicoidais dentro de uma molécula de proteína.

Dicroísmo Circular (CD)

Não conseguimos obter informações sobre as posições dos átomos na macromolécula, mas somos capazes de dizer se estão ocorrendo mudanças na conformação da proteína e, em caso positivo, correlacioná-las com as características do meio circundante.

Podemos saber, se mudanças de temperatura, ou de pH, ou a presença de outras moléculas no solvente são capazes de modificar a estrutura da proteína, e se essas modificações de estrutura afetam a atividade biológica da macromolécula.

Dicroísmo Circular (CD)

Estudos sobre o dobramento e a desnaturação de proteínas, e na pesquisa, tanto teórica como experimental, sobre os mecanismos pelos quais uma macromolécula tão grande adota um único arranjo estrutural tão particular e compatível com sua atividade em organismos vivos.

Espectroscopia

Nada mais é do que o levantamento de dados físico-químicos de um determinado sistema através da transmissão, absorção ou reflexão da energia radiante incidente.

No CD, a energia incidente é a ultravioleta comumente na faixa do UV próximo, 380 a 200 nm.

O espectro de CD é gerado pela diferença na capacidade de absorção dos componentes esquerdo e direito da luz circularmente polarizada por moléculas quirais que possuem átomos de carbono assimétricos e, conseqüentemente, diferentes atividades ópticas.

Os espectros de CD podem ser utilizados para diversos tipos de estudos, incluindo-se:

1. enovelamento e estrutura 2^aária de proteínas;
2. estrutura de proteínas de membrana inseridas em bicamadas lipídicas;
3. interação entre moléculas;
4. interações entre macromoléculas, destacadamente proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos;

5. monitoramento da integridade estrutural de moléculas sob aquecimento;
6. quantificação de alterações conformacionais;
7. caracterização de domínios de proteínas, a qual pode ser empregada em comparações com modelos gerados computacionalmente;
8. análise de carboidratos;
9. cinética rápida de enovelamento de proteínas e montagem de complexos macromoleculares, dentre outros.

Dicroísmo Circular Vibracional (VCD)

Fenômenos de dicroísmo circular que ocorrem na região do infravermelho.

Ele ocorre normalmente entre 3300 e 800 cm^{-1} .

O benefício experimental do VCD é que ligantes, como alguns carboidratos, possuem um sinal de CD muito menor quando comparado aos provenientes de uma proteína.

Dicroísmo Circular Vibracional (VCD)

O VCD pode ser utilizado para monitorizar a interação de proteínas com açúcares diretamente e sem a necessidade de manipulação matemática dos espectros.

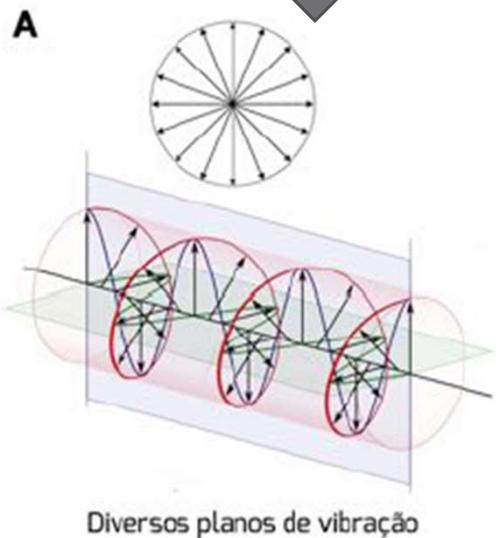
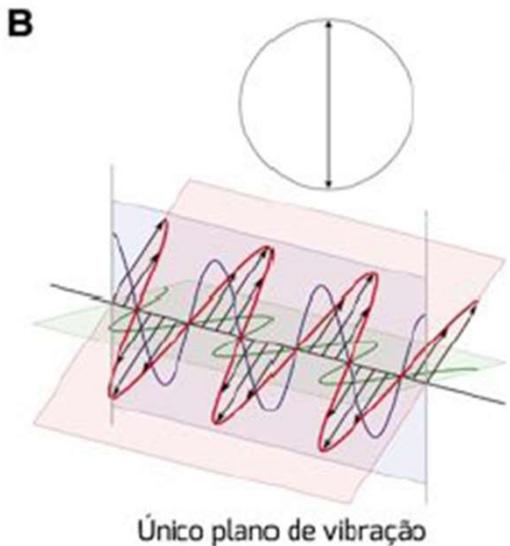
Luz polarizada



Luz não polarizada



Luz polarizada



Luz polarizada

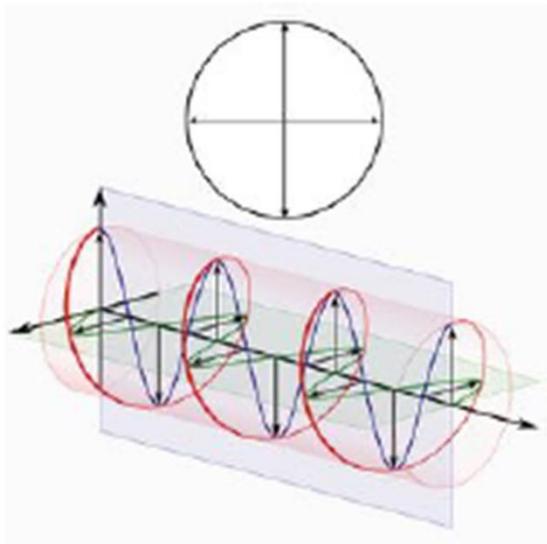


Figura 2-10: Representação planar da luz circularmente polarizada.

A diferença de absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda dá origem ao espectro de CD.

Assim, temos que $CD = AD - AE$

absorção da luz
circularmente
polarizada a direita

absorção da luz
circularmente
polarizada à
esquerda

Quiralidade

ão imagens que **não admitem plano de simetria.**

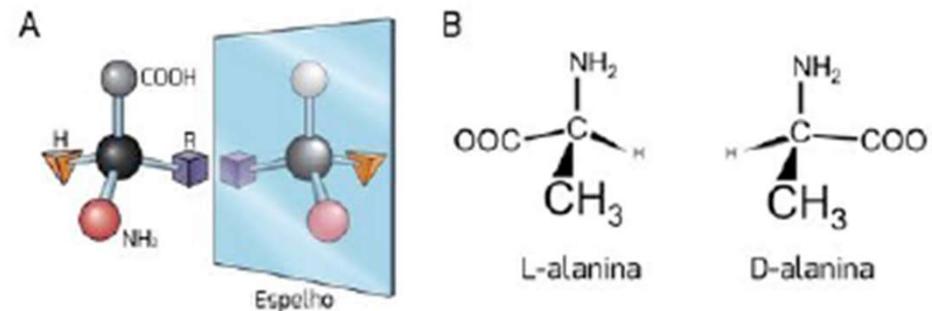


Figura 3-10: Representação da imagem especular (A) de dois enantiômeros do aminoácido alanina (B).

o CD, quando a luz polarizada passa através de uma substância quiral, seus componentes podem ser resolvidos e absorvidos com intensidades diferentes.

Quiralidade

$$\Delta A = AD - AE$$

Diferença de
absorbância

Luz polarizada para a
direita

Luz polarizada para a
esquerda

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon D - \varepsilon E$$

coeficientes molares de adsorção da
luz circularmente polarizada à direita
e a esquerda

Lei de Lambert-Beer

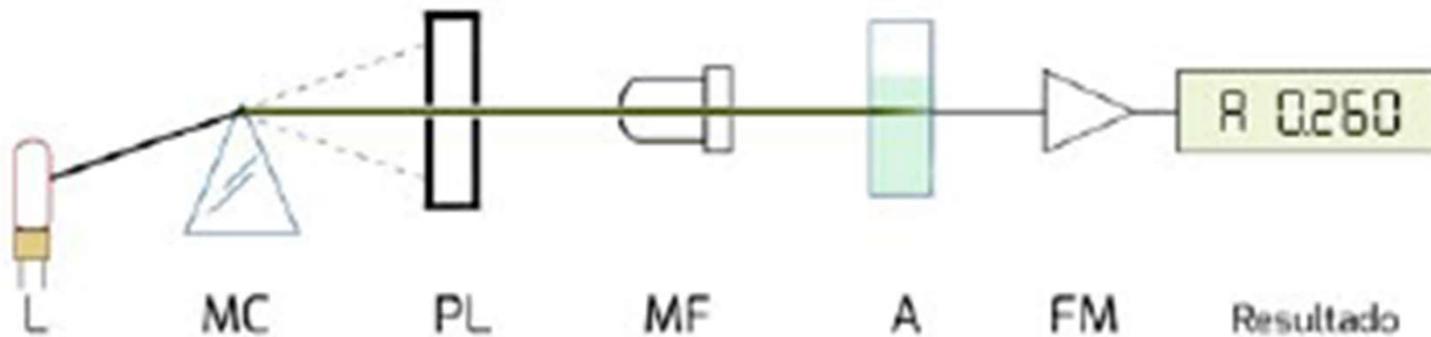
$$\Delta A = \Delta \epsilon c l$$

[] da amostra

comprimento
do percurso óptico

resultante de todas essas características darão origem
o espectro de CD de uma dada molécula.

Instrumentação



Representação esquemática de um espectrofotômetro de CD. Fonte de luz (L); Monocromador (MC); Polarizador linear (PL); Modulador fotoelástico (MF); Amostra (A); Fotomultiplicador (FM).

O componente de corrente alternada é filtrado e amplificado. A relação entre a corrente alternada e o componente de corrente contínua é diretamente proporcional ao dicroísmo circular da amostra, sendo esta relação registrada em função do comprimento de onda.

CADERNO DE FÍSICA DA UEFS, 03 (01): 21-29, 2004

TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EM BIOFÍSICA*

José Amando Ito

Instituto de Física - USP

Transições Eletrônicas

Absorção da radiação ultravioleta ou visível

→ excitação dos elétrons.

→ transições eletrônicas.

Transições eletrônicas → promoção dos elétrons de valência do estado de baixa energia (estado fundamental) para estados de mais alta energia (estado excitado).

$$\sigma > \sigma^*$$

$$\pi > \pi^*$$

$$\eta > \sigma^*$$

$$\eta > \pi^*$$

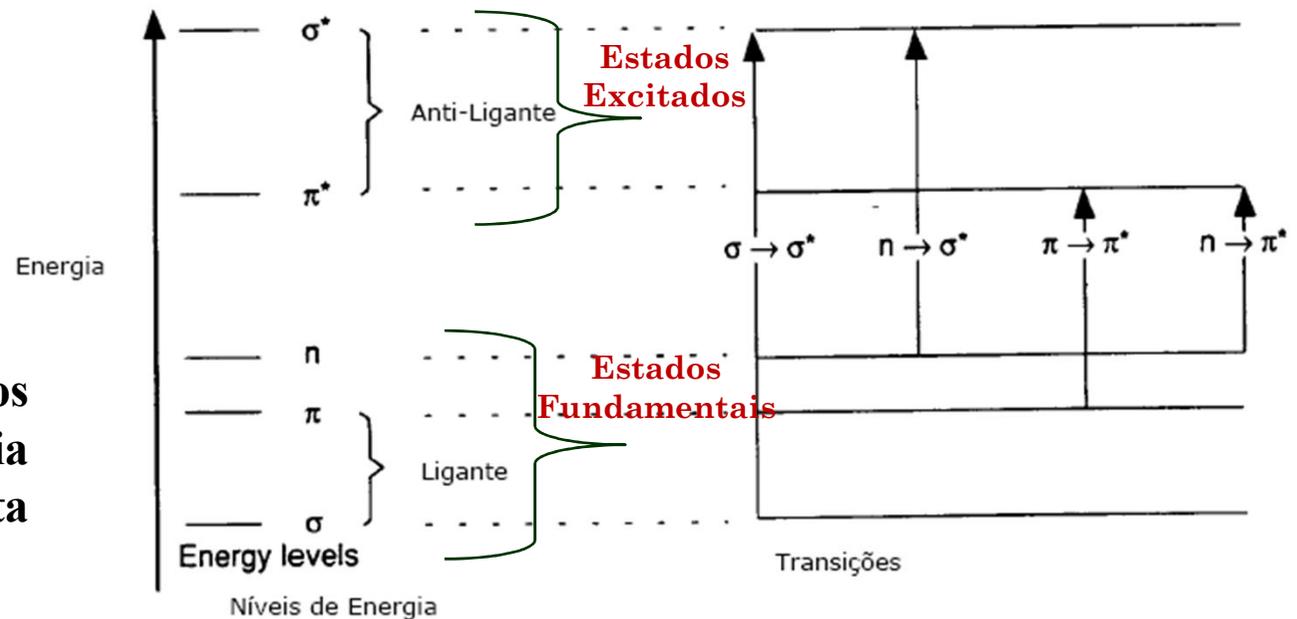
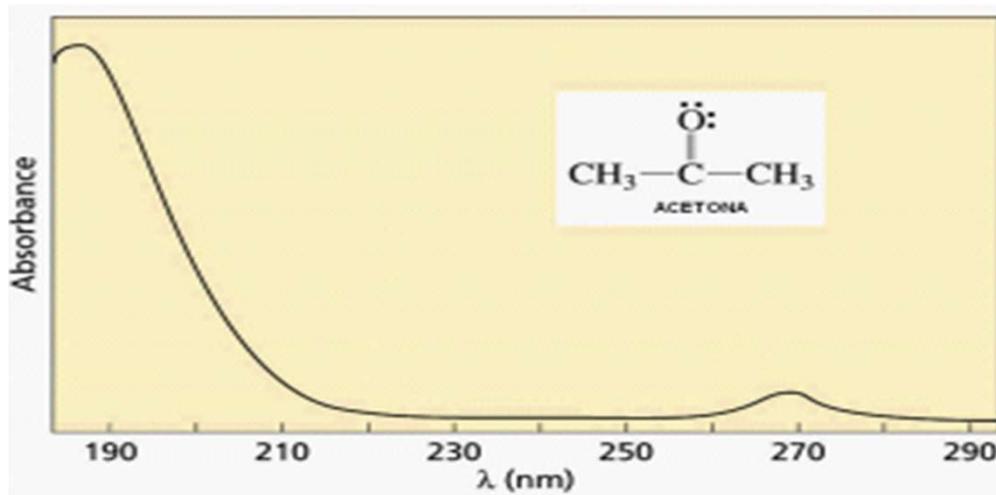


Figura 2: Transições eletrônicas em espectroscopia ultravioleta/visível [1].

Espectro UV



Os máximos de absorção devem-se à presença de cromóforos na molécula (Neste exemplo temos duas absorções em 190 e 270 nm)

Cromóforo

Átomo que absorve radiação.

Auxocromos

• Átomo que não absorve radiação.

• Modifica alguma característica da absorção do cromóforo.

Cromóforos simples na Espectroscopia UV

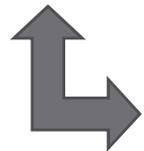
De acordo com as transições eletrônicas anteriores temos os seguintes cromóforos simples:

Elétrons implicados	Ligações	transição	λ_{\max} (nm)
Elétrons σ	C-C, C-H	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	150
	-O-	$n \rightarrow \sigma^*$	185
	-N-	$n \rightarrow \sigma^*$	195
Elétrons n	-S-	$n \rightarrow \sigma^*$	195
	C=O	$n \rightarrow \pi^*$	290
	C=O	$n \rightarrow \sigma^*$	190
Elétrons π	C=C	$\pi \rightarrow \pi^*$	190

Proteínas

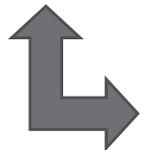
Na faixa do UV distante, os sinais relacionadas à ligação peptídica dominam o espectro de CD de proteínas.

I) Transições $n \rightarrow \pi^*$, por volta de 220 nm;



Possui coeficiente de absorção fraco, embora dê origem a bandas fortes de CD.

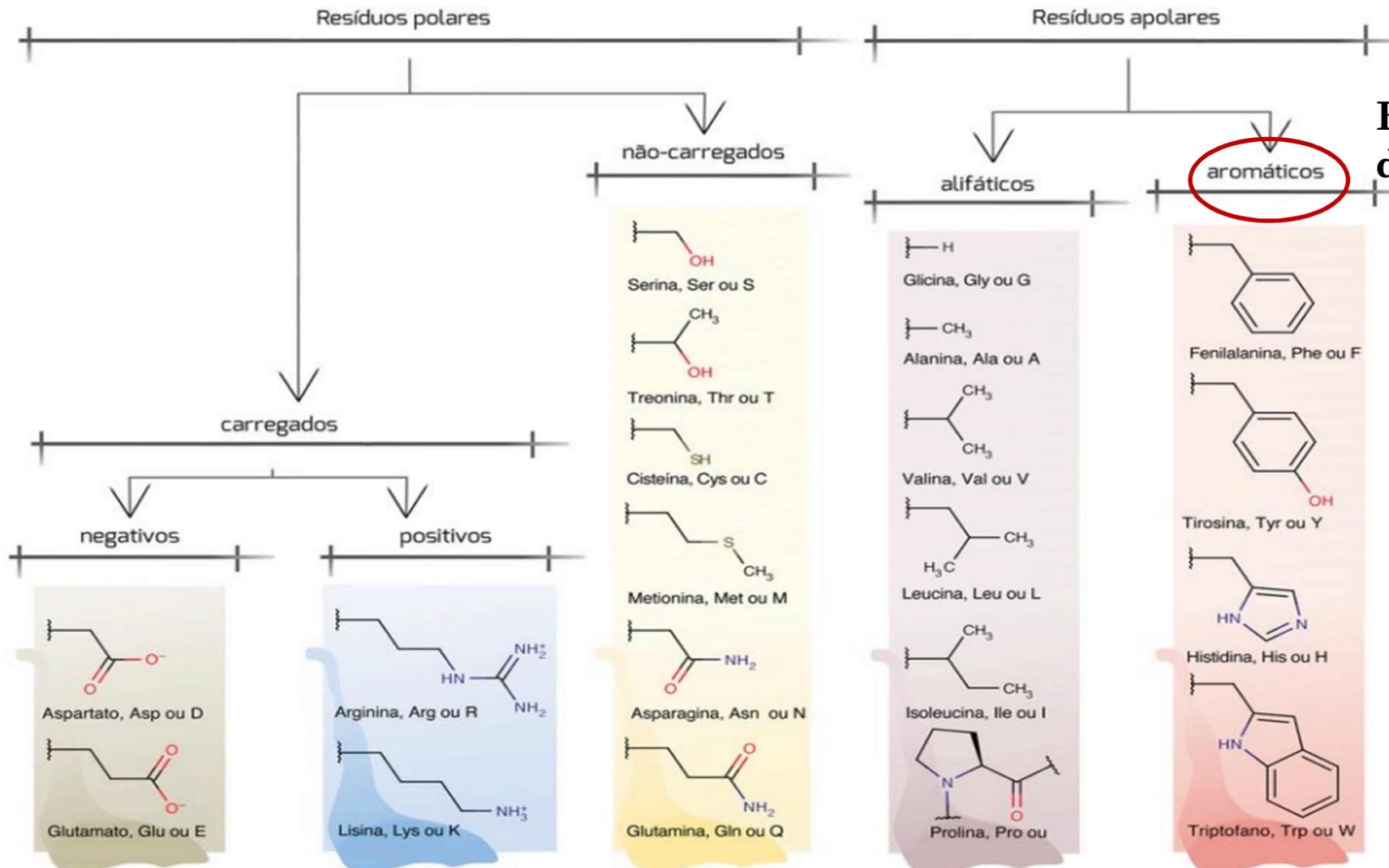
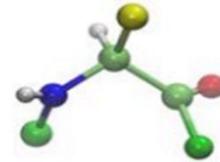
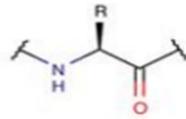
II) Transições $\pi \rightarrow \pi^*$, por volta de 190 nm para amidas secundárias (ligação peptídica para todos os aminoácidos, exceto a prolina), e em torno de 200 nm para amidas terciárias (ligação peptídica envolvendo prolina).



Está associada à elevada absorbância e fortes bandas de CD.

Representação 2D de um resíduo de aminoácido dentro de uma sequência polipeptídica

Representação 3D de um resíduo de aminoácido dentro de uma sequência polipeptídica



Fortes bandas de absorvância

Proteínas

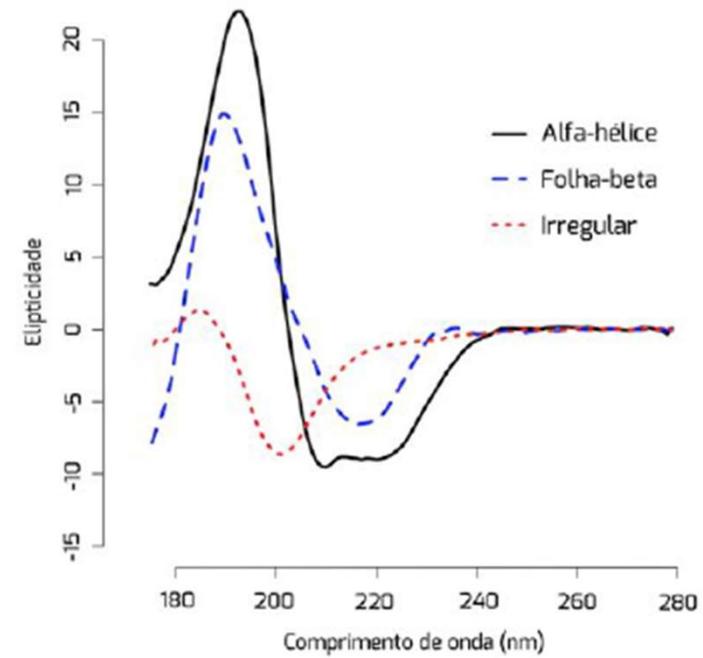
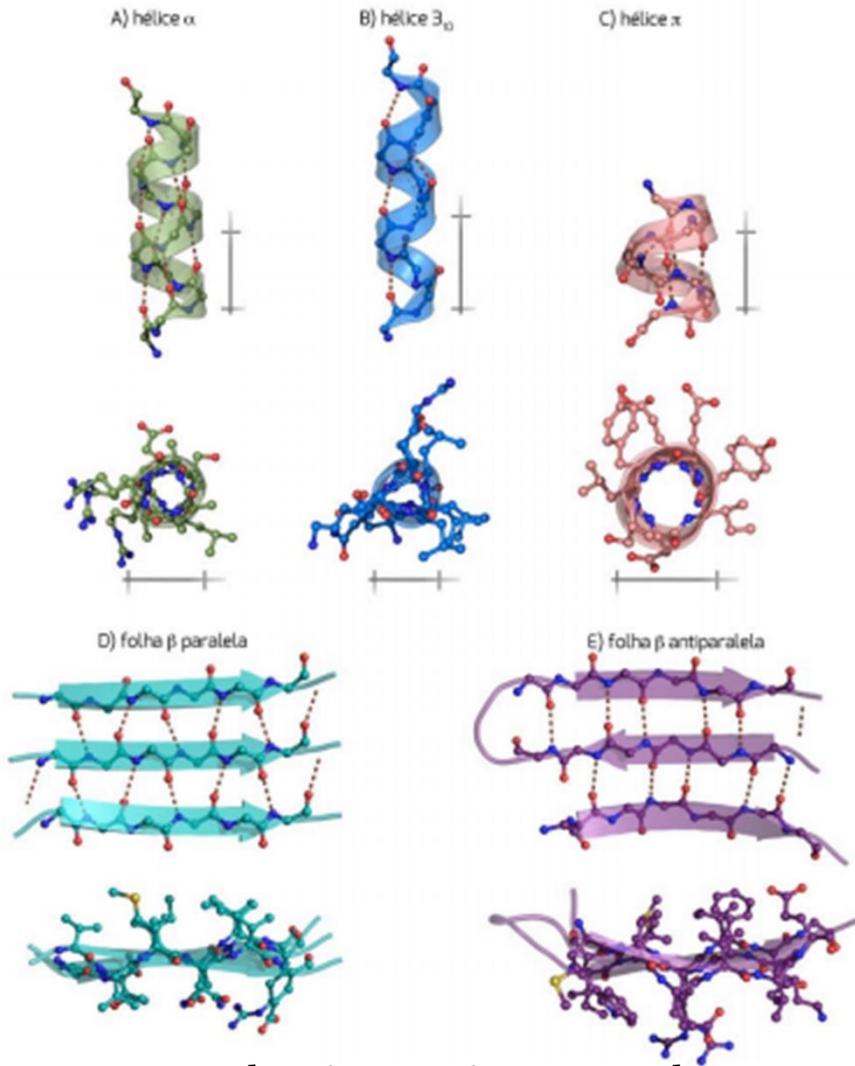


Figura 5-10: Espectros de CD de estruturas do tipo α -hélices, folhas- β e estruturas irregulares.

Representação dos tipos mais comuns de estrutura 2ária encontrados em proteínas.

Caracterização físico-química da isoforma

γ -tripsina bovina

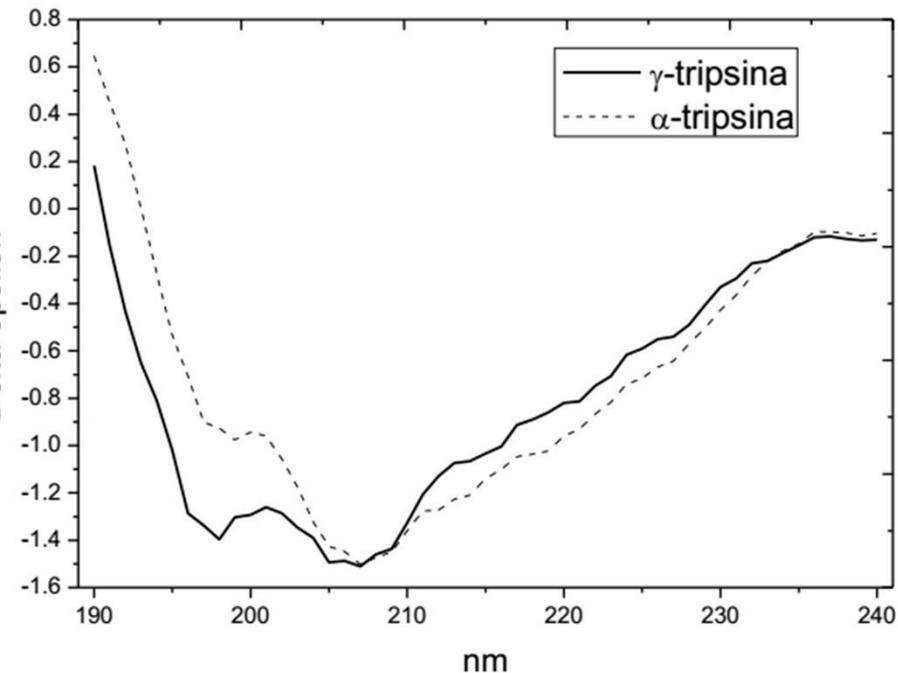


Figura 20: Espectro de dicroísmo circular das isoformas γ - e α -tripsina, em tampão tampão de sódio monobásico 30 mmol.L⁻¹, pH 3,0 a 298,15 K, para determinação da composição de estrutura secundária.

Tabela 1: Composição em estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina, em pH 3,0, obtida através do espectro de dicroísmo circular, analisado pelo software CDSSTR®.

Isoforma	Alfa hélice (%)	Folha beta (%)	Random coil (%)
γ -tripsina	7,3	35,0	57,3
α -tripsina	7,3	35,3	56,3
α -tripsina*	8	36	56

*Experimento realizado por (MARTINS, 1998).

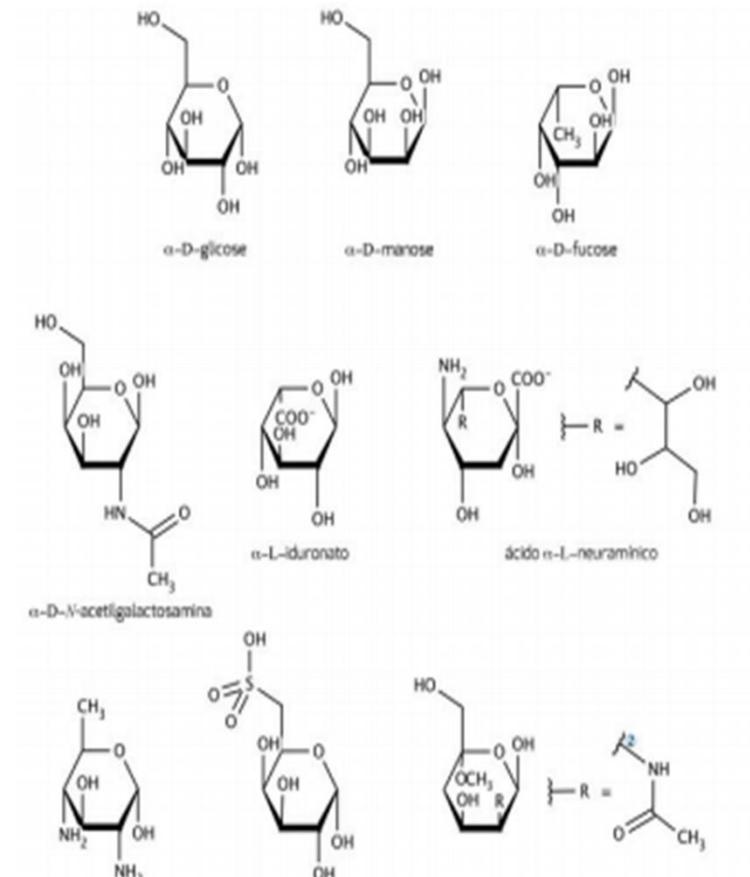
Caroline Dutra Lacerda
Dissertação de mestrado em Bioquímica e
Farmacologia-UFES 2014

Carboidratos

Dos cromóforos comuns aos carboidratos, apenas o grupo amida (açúcares N-acetilados) e grupos carboxila (ácidos urônicos) possuem bandas de CD acima de 200 nm.

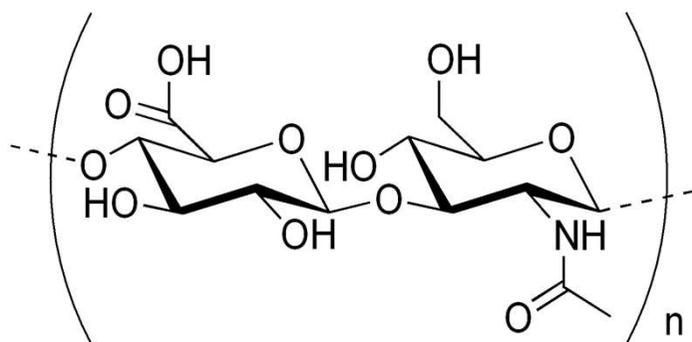
Grupamentos éter, hidroxila, acetal e cetal apresentam suas bandas de CD próximas do limite de detecção dos espectrofotômetros de CD convencionais, em torno de 190 nm.

Monossacarídeos têm sido extensivamente investigados, e algumas correlações conformacionais dos anéis podem ser extraídas em regiões do espectro de CD por volta de 170 nm.



Exemplo da complexidade de possíveis monossacarídeos encontrados na natureza.

Carboidratos



CD também tem sido bastante utilizado para estudo de complexos de carboidratos como glicosaminoglicanos.

As características dos espectros de glicosaminoglicanos provêm predominantemente das transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ dos carboxilatos dos resíduos de ácido urônico e das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos cromóforos N-acetila dos resíduos de glicosamina.

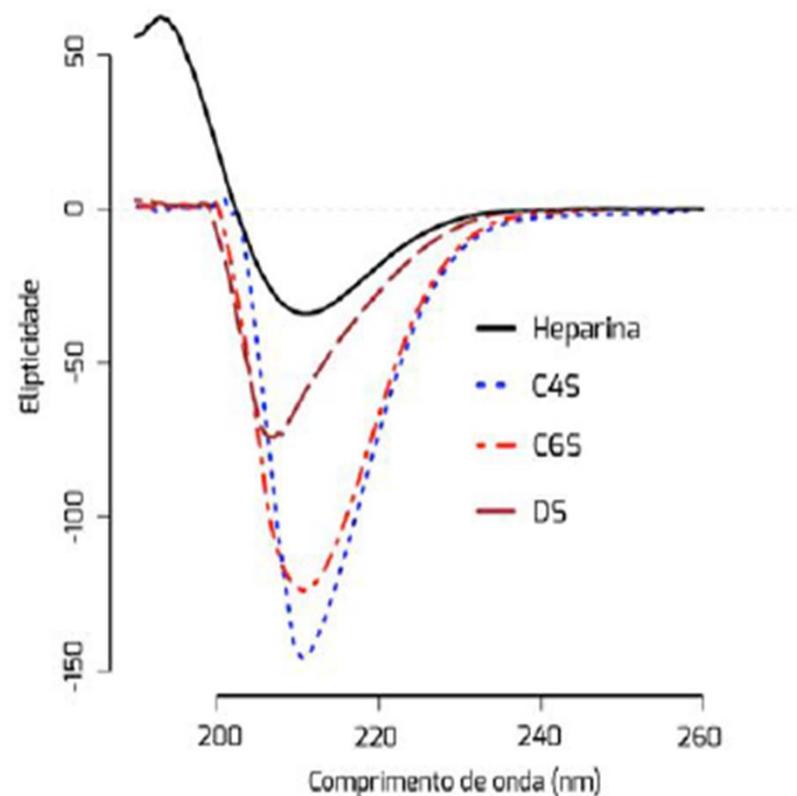
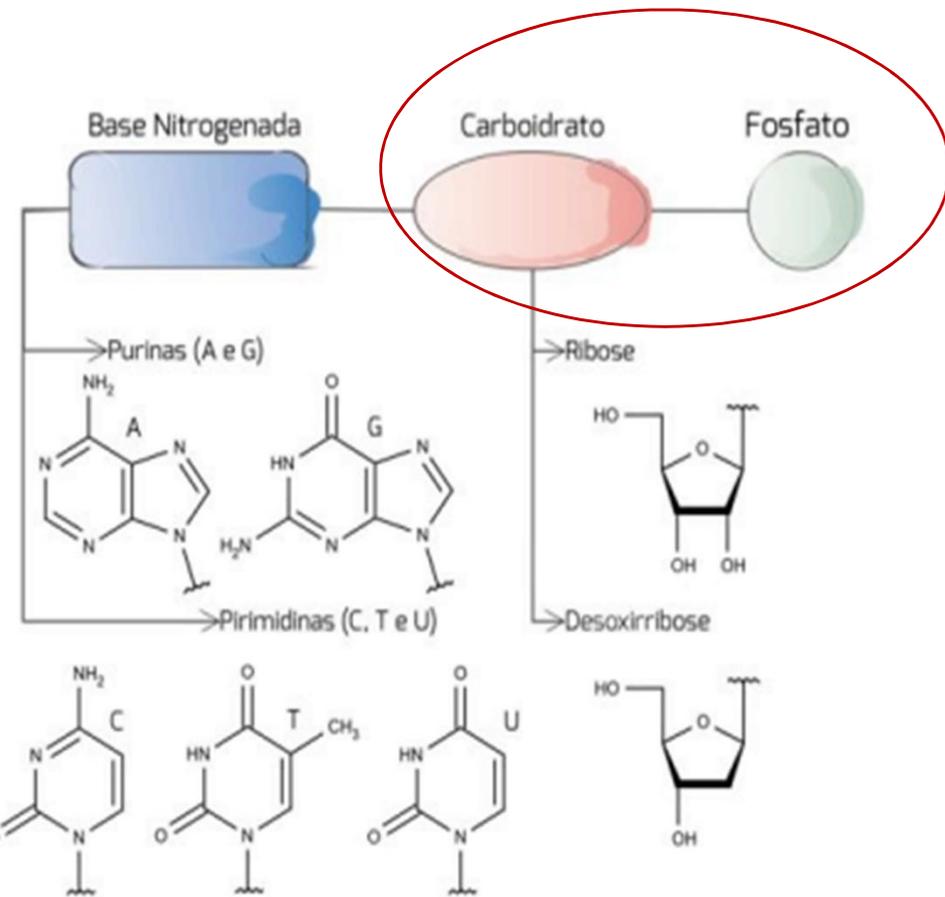


Figura 6-10: Espectro de CD de diferentes glicosaminoglicanos. C4S, condroitina 4-sulfatada; C6S, condroitina 6-sulfatada; DS, dermatam sulfato e heparina.

Ácidos Nucleicos



As bases purínicas e pirimidínicas de DNA e RNA são, em grande parte, responsáveis pelo espectro de CD de ácidos nucleicos.

Os carboidratos e grupos fosfato não absorvem significativamente acima de 200 e 180 nm, respectivamente.

Figura 2-2: Representação esquemática de um nucleotídeo e suas variações na base nitrogenada e no carboidrato.

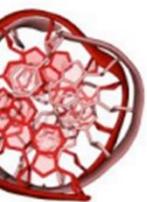
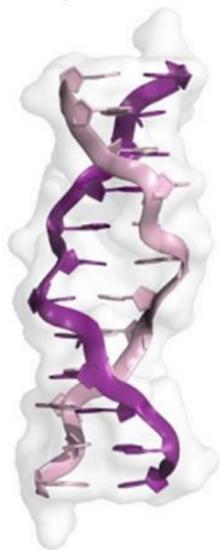
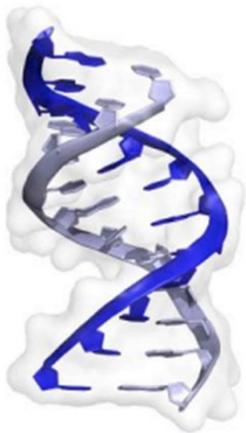
Solução Aquosa

Solventes Orgânicos

A) DNA-B

B) DNA-A

C) DNA-Z



Representação dos tipos mais comuns de estrutura 2ária encontrados no DNA

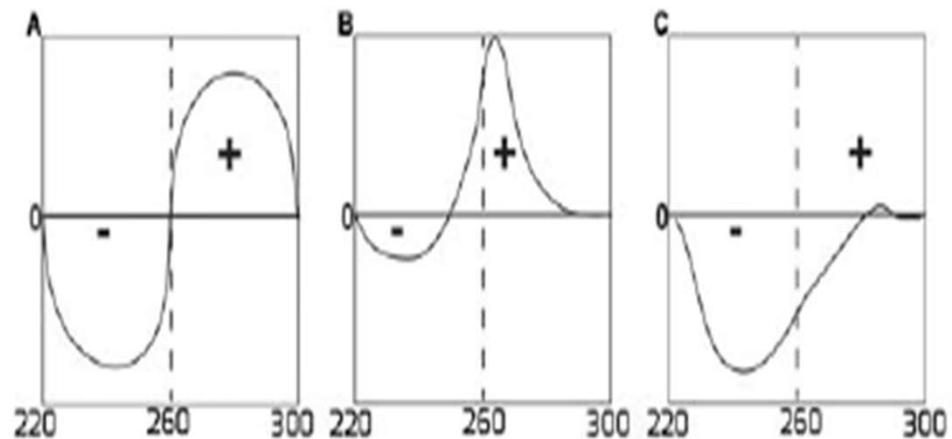


Figura 7-10: Representação esquemática dos espectros de CD para as diferentes estruturas secundárias de DNA.

Nota: Contudo, devido ao número considerável de subgrupos de estrutura 2ária e à dependência desta da sequência de nucleotídeos, informações detalhadas sobre a conformação do DNA não podem ser extraídas unicamente baseadas no espectro de CD.

Lipídeos

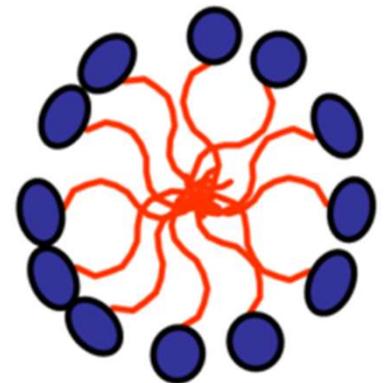
Aplicações de CD no estudo de lipídeos são raras, sendo sua mais frequente aplicação no estudo de proteínas de membrana em seu ambiente nativo, ou seja, inseridas na membrana

Suspensões de fragmentos de membrana podem induzir fortes efeitos de espalhamento de luz.

→ Podem apresentar espalhamento preferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. Tal fenômeno se comporta como um sinal de CD, distorcendo o verdadeiro CD da proteína.

Fragmentos de membrana também distorcem os sinais de CD devido a um efeito conhecido como Duysens' flattening

→ Este efeito ocorre em amostras com uma distribuição não homogênea de cromóforos que estão associados com a formação de micelas.



Situações Práticas

Deconvolução espectral

- Utilizada para a resolução e/ou decomposição de um conjunto de sinais sobrepostos nos seus componentes separados através de algoritmos de ajuste de curva.
- A proporção de cada tipo de estrutura é calculada, totalizando 72% hélices α , 16% de folhas β e 12% de estruturas irregulares.

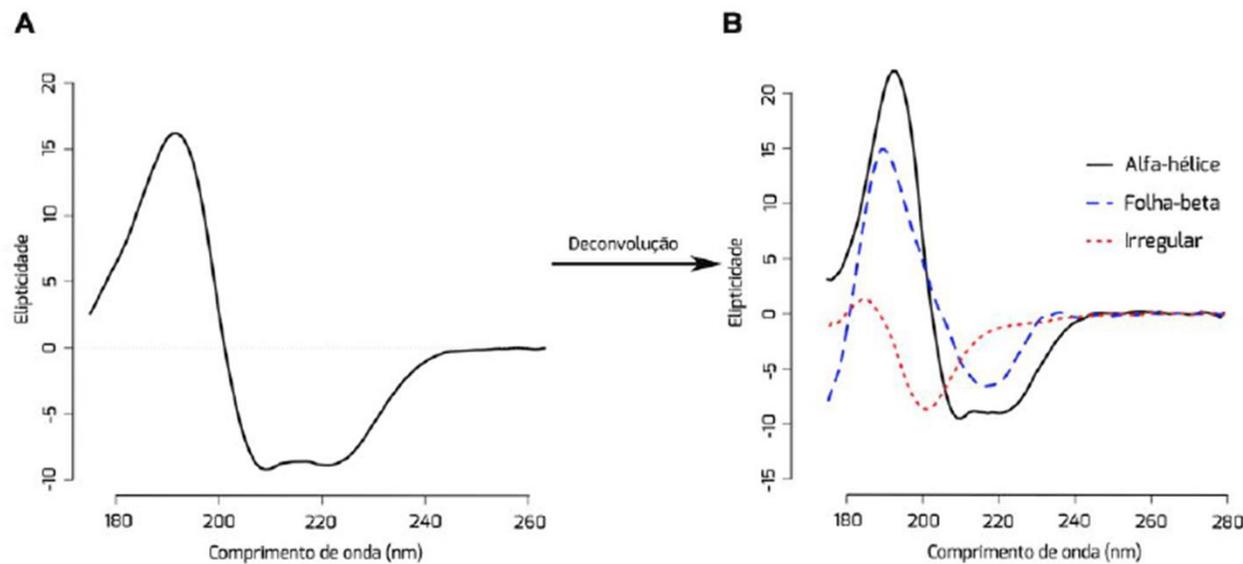
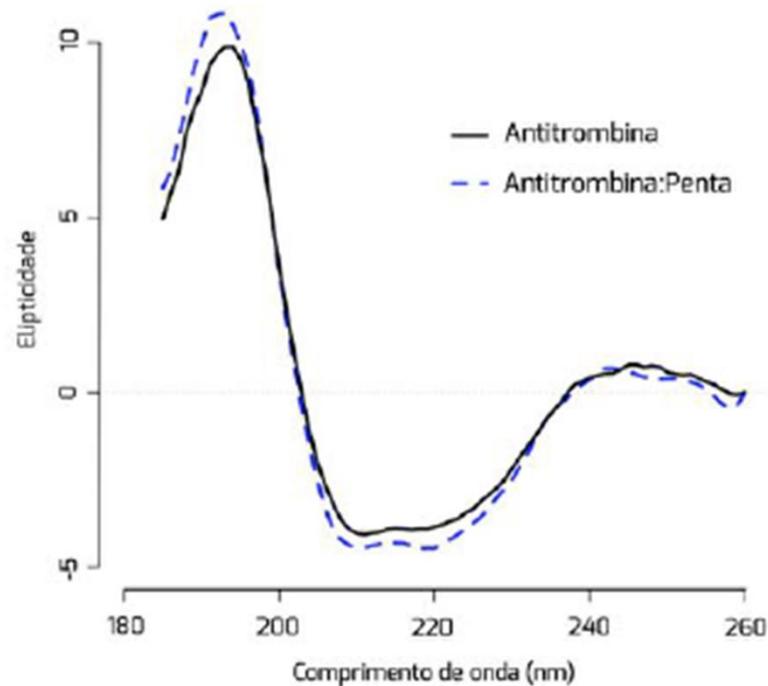


Figura 8-10: Deconvolução espectral esquemática da albumina sérica humana.

Interação proteína-ligante



- Mudanças conformacionais sofridas por uma dada proteína após sua complexação a um determinado composto também podem ser determinadas por CD.
- Alterações na estrutura 2ªria da proteína, promovidas por esta complexação, irão mudar o espectro de CD, de forma que algumas mudanças conformacionais podem ser detectadas.

Figura 9-10: Espectro de CD da antitrombina humana (linha preta) e do complexo antitrombina:pentassacarídeo (linha azul).

Aquisição de um espectro de CD

Utilizar tampões quirais e que possuem forte absorção no UV, principalmente na faixa entre 180-200nm;

Filtrar todas as soluções, inclusive a amostra a ser estudada, evitando assim a presença de partículas causadoras de espalhamento de luz;

Antes de coletar o espectro para a amostra em estudo é importante coletar um branco que nada mais seja que o espectro do tampão;

Em experimentos comparativos, usar sempre as mesmas condições experimentais, tais como **temperatura, tampão utilizado, concentração dos componentes, comprimento do caminho óptico e resolução.**

5) Para proteínas, é importante coletar espectros em diferentes concentrações e observar se há mudança nos sinais. Havendo mudanças, a proteína em estudo está agregando;

6) Para açúcares, é importante mantê-los na mesma forma catiônica, uma vez que diferentes contra-íons produzirão espectros distintos.



Espectropolarímetros de dicroísmo circular. Jasco J815