

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



Trabajo Practico nº2

Espectroscopía de absorción UV-Visible de proteínas hémicas y de Cu.

Introducción

Las Porfirinas (Figura 1) son una clase de macrociclo natural que pueden ser encontradas en biomoléculas importantes/claves para el metabolismo de los seres vivos. Las porfirinas pueden ser encontradas en organismos de todos los Reinos de la vida y se piensa que habrían estado involucradas en los procesos metabólicos más antiguos de la Tierra.

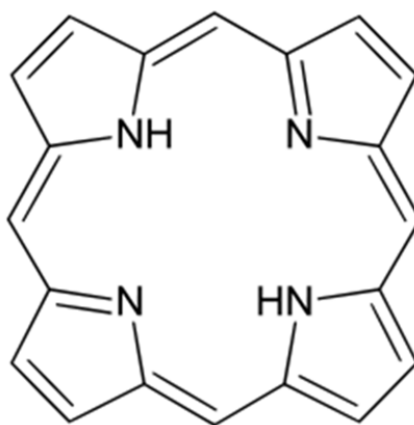


Figura 1. Estructura de la porfirina.

Algunos de los ejemplos más conocidos son las porfirinas que contienen hierro (e.g. hemoglobina) y las porfirinas que contienen magnesio (e.g. clorofilas). La presencia de porfirinas “moldearon” de alguna forma la vida tal como la conocemos, y por lo tanto estudiar y conocer el funcionamiento de estos sistemas (e.g. estructura electrónica, estados excitados, coordinación de ligandos, etc.) es esencial para entender varios procesos biológicos, que incluye la unión de

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



oxígeno (Hb), transferencia de electrones (citocromos, etc.), catálisis enzimática (citocromo P450, catalasa, etc.), y la captación de la luz en la fotosíntesis (fotosistemas I y II).

Las porfirinas son una clase de pigmento de color intenso, de origen natural o también sintético. Constan de un anillo macrocíclico aromático sustituido, y se compone de cuatro anillos de pirrol unidos por cuatro puentes de metino (Figura 1). Estas moléculas han atraído mucha atención no solo debido a que son ubicuas en organismos vivos, sino también porque tienen aplicaciones para llevar a cabo catálisis, terapia fotodinámica, dispositivos electrónicos moleculares y la conversión de la energía solar. Como consecuencia de su estructura característica de anillo de dobles enlaces conjugados poseen propiedades especiales de absorción, emisión, transferencia de carga, y capacidad de ligar moléculas. Es básicamente gracias a esto que las porfirinas desempeñan papeles tan importantes en la naturaleza.

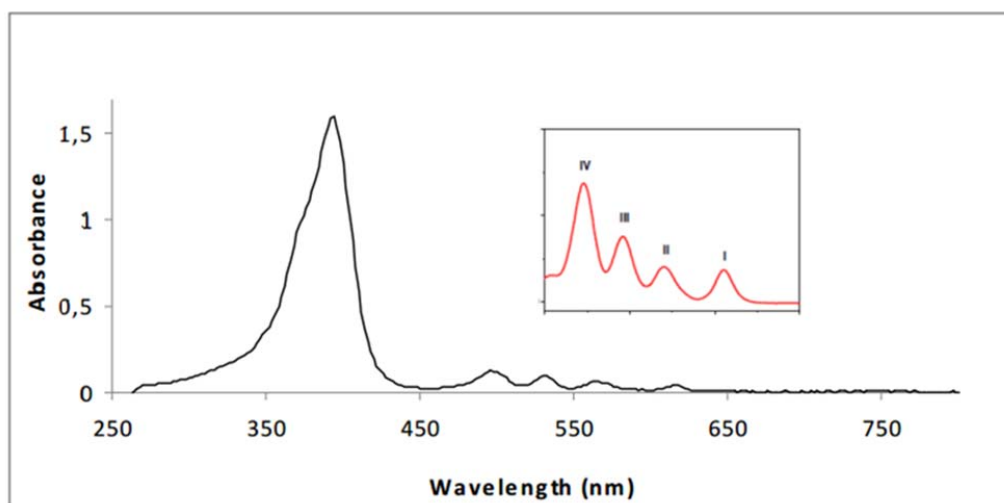


Figura 2. Espectro de absorción UV-Vis de una porfirina sin metal, como mostrado en la Figura 1.

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



En cuanto a su espectro de absorción electrónica (Figura 2), las porfirinas muestran bandas de absorción muy intensas (banda Soret o banda B) en el rango 380-450 nm con coeficientes de extinción molar del orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Además, a longitudes de onda en el rango 500-750 nm, contiene un conjunto de bandas de absorción más débiles (bandas Q) con coeficientes de extinción molar del orden de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Las características del espectro de absorción de las porfirinas fue explicada usando la "teoría de cuatro orbitales" (los dos orbitales π ocupados más altos, y los dos orbitales π^* desocupados más bajos). Este modelo fue aplicado por primera vez en 1959 por Martin Gouterman y estableció la importancia de la localización de carga en las propiedades espectroscópicas, particularmente de absorción electrónica. El modelo de cuatro orbitales propuesto en la década de 1960 sirvió para explicar los espectros de absorción de las porfirinas (Gouterman, 1959; Gouterman, 1961).

En el caso de la Figura 3, las bandas espectrales pueden explicarse basándose en la teoría de grupos, la cual plantea que las metaloporfirinas tienen una geometría D_{4h} donde sólo son posibles orbitales a_{1u} , a_{2u} , b_{1u} , b_{2u} y e_g (Gouterman, 1961). En el modelo de Gouterman de los cuatro orbitales moleculares π donde se propone transiciones de electrones desde el HOMO, π de la porfirina, al LUMO π^* (Figura 3B), cuya diferencia de energía es lo suficientemente pequeña para generar bandas de absorción en la región del visible y ultravioleta cercano del espectro. A través de cálculos de tipo Huckel demuestran que el orbital a_{2u} tiene mayor energía

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



que el orbital a_{1u} . Por ello a la banda Soret o B (400-430 nm) se asignan transiciones $a_{1u} \rightarrow e_g$ y las bandas Q (500-700 nm) a transiciones $a_{2u} \rightarrow e_g$ (Figura 3B). Según el modelo de Gouterman las 4 bandas Q en porfirinas no son debidas sólo a diferentes transiciones electrónicas sino que se encuentran asociadas a niveles vibracionales $0 \rightarrow 0$ y $0 \rightarrow 1$ de una transición monoeléctronica.

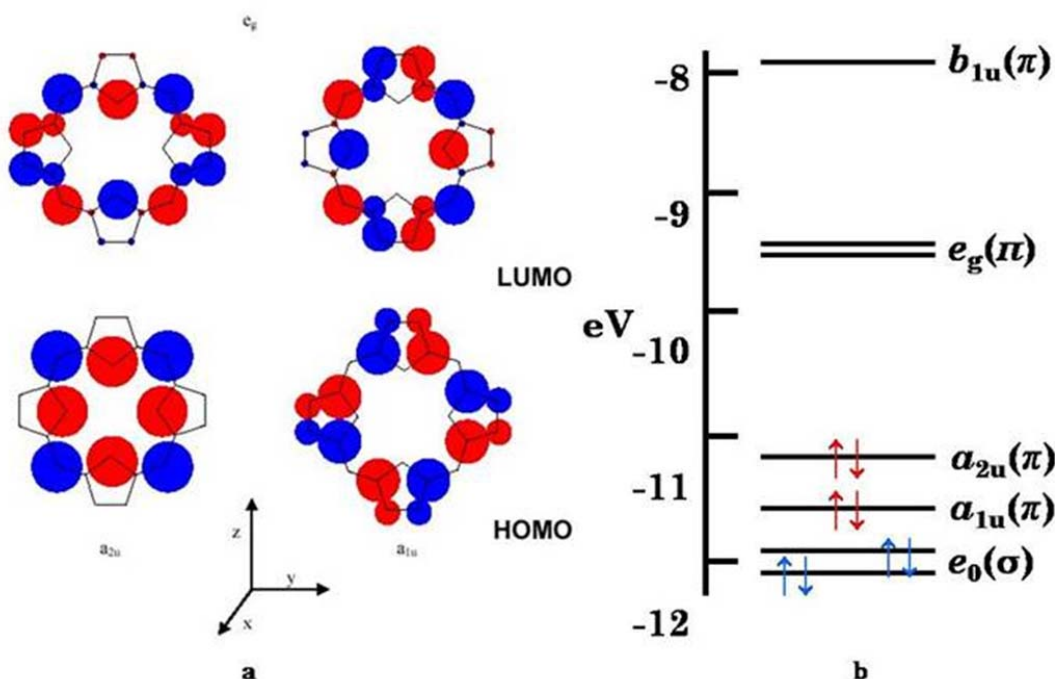


Figura 3. (Derecha) Representación de los cuatro orbitales Gouterman en las porfirinas. (B) Esquema de niveles de energía de los cuatro orbitales de Gouterman (asumiendo simetría D_{4h}). Transiciones hacia orbitales e_g dan lugar a las bandas B y Q.

Más adelante se realizaron los mismos cálculos pero asumiendo que las porfirinas poseen simetría C_{2v} . En este caso las energías de los orbitales moleculares a_{1u} , a_{2u} y e_g son diferentes, de acuerdo a la (Figura 4).

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

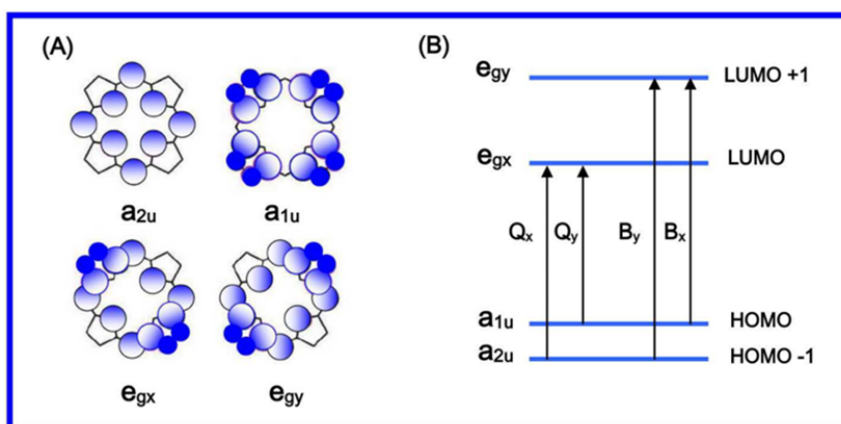


Figura 4. (Derecha) Representación de los cuatro orbitales Gouterman en las porfirinas. (B) Esquema de niveles de energía de los cuatro orbitales de Gouterman (asumiendo simetría C_{2v}). Transiciones hacia orbitales e_g dan lugar a las bandas B y Q.

En este caso, ahora la banda Soret se debe a transiciones electrónicas entre los orbitales $a_{1u} \rightarrow e_{gy}$ y $a_{2u} \rightarrow e_{gy}$, mientras que las bandas Q son debidas a $a_{1u} \rightarrow e_{gx}$ y $a_{2u} \rightarrow e_{gx}$ (con sus acoplamientos vibrónicos respectivos).

En definitiva, para ambos casos (simetría D_{4h} o C_{2v}) las bandas de absorción en sistemas con porfirinas se deben a transiciones desde orbitales HOMO y HOMO-1 hacia orbitales LUMO y LUMO+1.

Dependiendo del metal unido en el centro del macrociclo (Fe, Mg, Co, Zn, etc.) y los sustituyentes que posea este último, las energías relativas de estas transiciones cambiará, dando lugar a espectros de absorción característicos.

Por otra parte, la intensidad relativa de las bandas Q se debe al tipo y posición de los sustituyentes en el macrociclo. Basándose en esto las porfirinas se pueden clasificar como: *etio*,

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FBCB

UNL

rhodo, *oxo-rhodo* y *phyllo* (Prins et al 2001). Cuando las intensidades relativas de las bandas de Q son tales que $IV > III > II > I$, se dice que el espectro es de tipo *etio*, y por lo tanto se llaman etioporfirinas. Este tipo de espectro se encuentra en porfirinas en el que seis o más posiciones β del macrociclo están sustituidos con grupos sin electrones π (e.g. $-\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$).

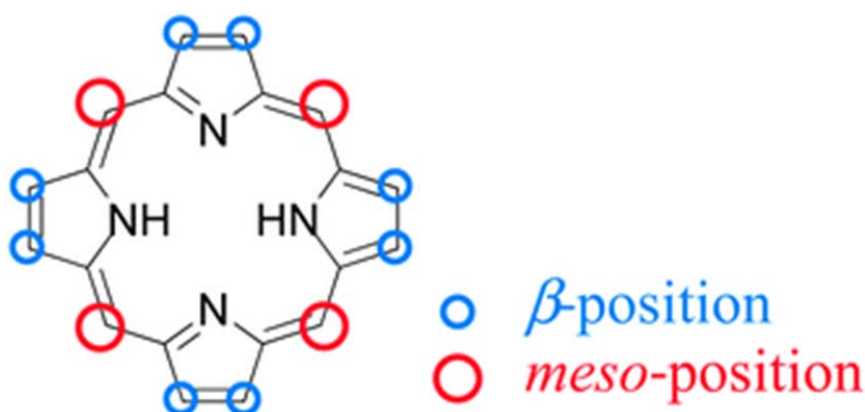


Figura 4. Localización de las posiciones beta y meso en una porfirina.

Sustituyentes con electrones π (e.g. grupos carbonilo $-\text{C}=\text{O}$, o vinilo $-\text{CH}=\text{CH}_2$) unidos directamente a las posiciones β dan un cambio en las intensidades relativas de las bandas de Q (i.e. $III > IV > II > I$). Esto se denomina espectro de tipo *rhodo* (rhodoporphyrin), y la porfirina tendrá un color más rojo debido a que estos grupos hacen que las bandas Q se desplacen hacia longitudes de onda mayores. Sin embargo, cuando estos grupos están en unidades de pirrol opuestas, el enrojecimiento se intensifica para dar un espectro de tipo *rhodo-oxo* en el que $III > II > IV > I$. Por otro lado, cuando las posiciones meso están ocupadas, el espectro es de tipo *phyllo*, y en este caso las intensidades relativas de las bandas Q es $IV > II > III > I$ (Milgron 1997).

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

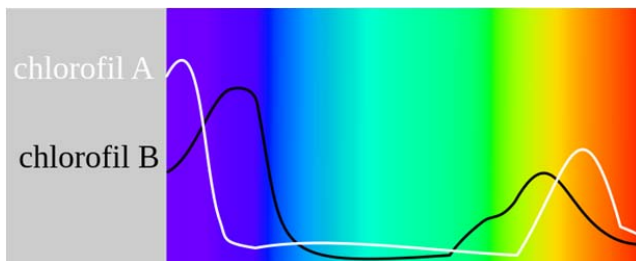
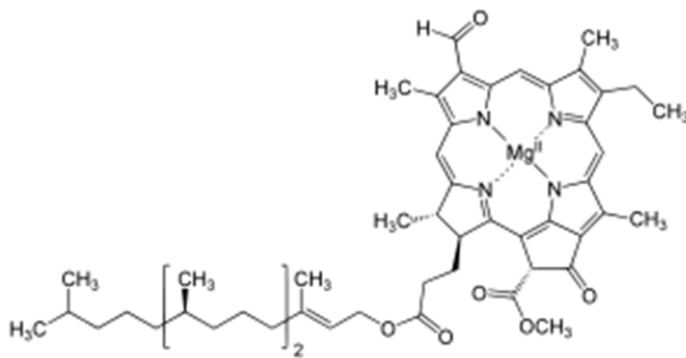
Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

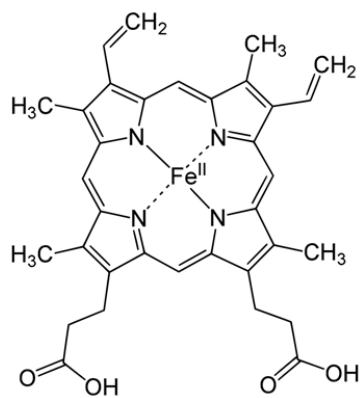
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FBCB

UNL



Clorofila A y B: que tipo de porfirinas son?



...y el hemo B, que tipo de porfirina posee?

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



Sin embargo, las variaciones periféricas del macrociclo afectan poco el espectro de absorción UV-Visible cuando comparamos el efecto del metal y su estado de oxidación, o presencia/ausencia de ligandos (y protonaciones del macrociclo). En este sentido, cuando el macrociclo porfirínico está protonado o coordinado a cualquier metal, el patrón de bandas Q en lugar de mostrar cuatro bandas solo muestra dos. O sea que cuando se forma la metalo-porfirina el espectro de absorción UV-Visible cambia. Las dos bandas Q ahora se denominan α y β , y sus intensidades relativas se pueden correlacionar con propiedades estructurales, (e.g. la estabilidad del complejo, estado de oxidación, presencia de ligandos, etc.).

Objetivos:

- Observar los diferentes estados interconvertibles de la Hemoglobina humana mediante espectroscopía de absorción UV-Vis.
- Comparar los espectros de absorción y analizar las propiedades magnéticas que poseerían las formas oxi-, deoxi- y met-hemoglobina.
- Con el uso de diferentes agentes reductores, obtener espectros de las formas oxidadas y reducidas del citocromo c aislado a partir de corazón de caballo (hhCytC – horse heart cytochrome *c*) y del citocromo c_3 de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (*Dd cc3*).

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

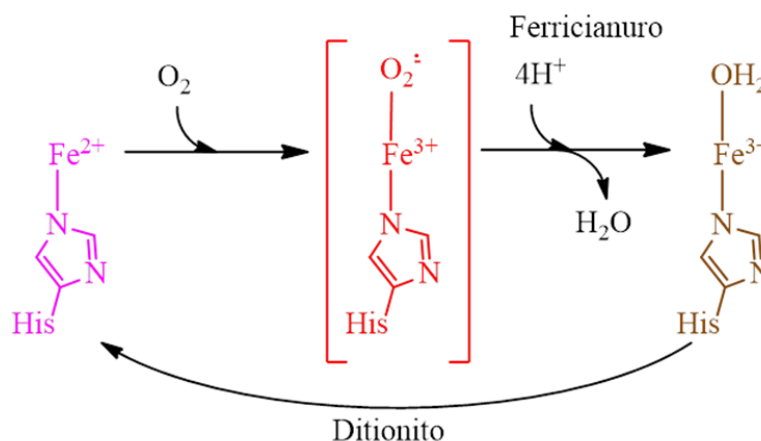
FBCB

UNL

Metodología:

1- Obtención de las diferentes formas de la Hb humana.

- Preparar una solución de Hb humana de acuerdo al protocolo indicado por el docente. La $A_{\text{Soret}} = 1.00$, MW: 64.5 kDa.
- La Hb en sangre venosa debería contener las formas carbamino-, deoxy- y oxy-Hb. Pero en atmosfera aeróbica en solución tamponada a pH 7.0 predominan principalmente las formas deoxy y oxy-Hb. Por ello, primeramente se agita la solución tamponada (en vortex) en un tubo abierto a la atmosfera. De esta forma obtendremos el estado oxy-Hb. Adquirir un espectro en el rango 800-250 nm.
- Luego se agregan 20 μL de $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$, al 0.4 % (W/V), previamente preparado en 0.2 M buffer fosfato pH 7.0. De esta forma obtendremos el estado met-Hb.
- Luego se agregan 50 μL de ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), 50 mg/mL previamente preparado en 0.2 M buffer fosfato pH 7.0. De esta forma obtendremos el estado Deoxy-Hb.



Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



2- Obtención de las formas oxidadas y reducidas del citocromo *c* de corazón de caballo (*hhCytC*), citocromo *c*₃ de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (*Dd cc*₃), y pseudoazurina de *Sinorhizobium meliloti* (*Sm Paz*).

- a. Preparar una solución de *hhCytC*, *Dd cc*₃ y *Paz* de acuerdo al protocolo indicado por el docente. La $A_{\text{Soret}} = 0.50$
 - i. *hhCytC*: ($\epsilon = 96 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) $\rightarrow C \sim 65 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (MW: 12.4 kDa).
 - ii. *Dd cc*₃: ($\epsilon = 400 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) $\rightarrow C \sim 15 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (MW: 11.6 kDa).
 - iii. *Sm Paz*
- b. Adquirir un espectro de cada solución de citocromos en el rango 800-250 nm. *Estos espectros corresponden a las formas oxidadas.*
- c. Agregar 50 μL de ascorbato de sodio ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$), 50 mg/mL previamente preparado en 0.2 M buffer fosfato pH 7.0. Adquirir un espectro de cada solución de proteínas (citocromos y *Paz*) en el rango 800-250 nm.
- d. Agregar 50 μL de ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), 50 mg/mL previamente preparado en 0.2 M buffer fosfato pH 7.0. Adquirir un espectro de cada solución de citocromos en el rango 800-250 nm.