

Trabajo Practico n°2

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 claves para el metabolismo de los seres vivos. Las porfirinas pueden ser encontradas en organismos de todos los Dominios de la vida (*Prokaryota* y *Eukaryota*) y se piensa que habrían estado involucradas en los procesos metabólicos más antiguos de la Tierra.

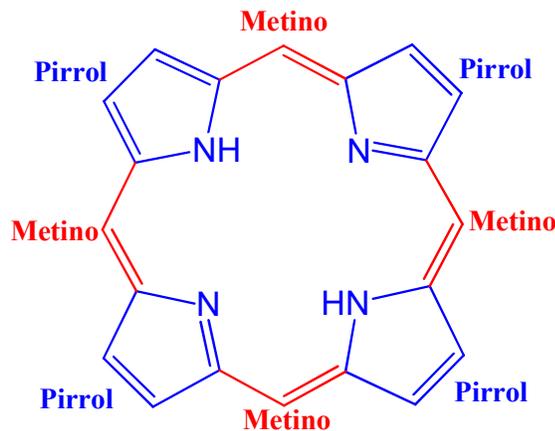


Figura 1. Estructura de la porfirina.

Algunos de los ejemplos más conocidos son las porfirinas que contienen hierro (e.g. hemoglobina, mioglobina) y las porfirinas que contienen magnesio (e.g. clorofilas). La presencia de porfirinas “moldearon” la vida tal como la conocemos. 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, por ejemplo, la unión de oxígeno (Hb y Mb), transferencia de electrones (citocromos, etc.), catálisis enzimática (citocromo P450, catalasa, etc.), y la captación de la luz en la fotosíntesis (clorofila de fotosistemas I y II).

Las porfirinas son una clase de pigmento de color intenso de origen natural, aunque también pueden ser sintetizadas en un laboratorio. Constan de un anillo macrocíclico aromático sustituido, y se compone de cuatro anillos de pirrol unidos por cuatro puentes de metino (Ver Figura 1). Estas moléculas han atraído mucha atención no solo debido a que son ubicuas en organismos vivos, sino también porque tienen muchas aplicaciones, por ejemplo, para catálisis, terapia fotodinámica, dispositivos electrónicos moleculares, y la conversión de la energía solar. La estructura característica de anillos y dobles enlaces conjugados provee a las porfirinas de

propiedades especiales de absorción, emisión, transferencia de carga, y capacidad de ligar moléculas. Gracias a esto las porfirinas desempeñan papeles tan importantes en la naturaleza.

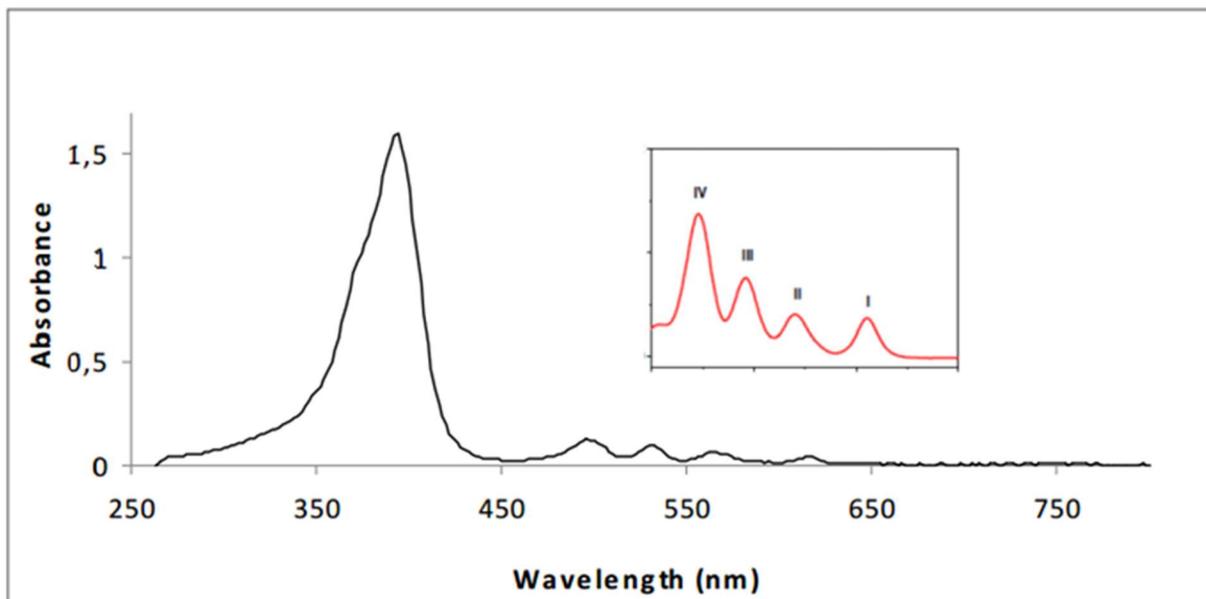


Figura 2. Espectro de absorción UV-Vis de una porfirina sin metal, como mostrado en la Figura 1.

El espectro de absorción electrónica (Figura 2) de las porfirinas muestra varias bandas de absorción muy intensas: la banda Soret (o banda B) en el rango 380-450 nm posee un coeficiente de extinción molar (ϵ) en el orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y, 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 fueron explicadas usando la "teoría de cuatro orbitales" (los dos orbitales π ocupados de mayor energía, y los dos orbitales π^* desocupados de menor energía). 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 en espectroscopía 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).

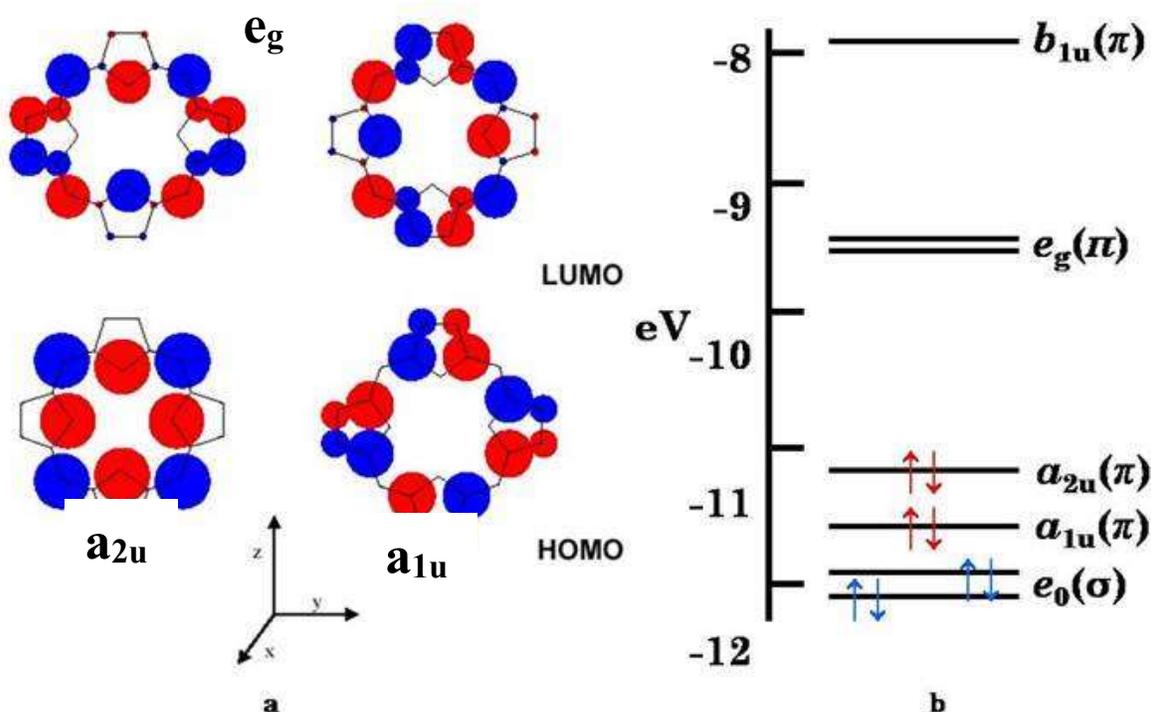


Figura 3. (Izquierda) Representación de los cuatro orbitales Gouterman en las porfirinas CUANDO EL METAL NO ESTÁ COORDINADO Y LA PROFIRINA DEPROTONADA. (Derecha) Esquema de niveles de energía de los cuatro orbitales de Gouterman (asumiendo simetría D_{4h}). Transiciones desde orbitales a_{1u} y a_{2u} hacia los orbitales e_g dan lugar a las bandas Q y B, respectivamente.

En el caso de la Figura 3, los autores asumieron que las porfirinas tienen una simetría D_{4h}, lo que implicaría que sólo son posibles orbitales tipo a_{1u}, a_{2u}, b_{1u}, b_{2u} y e_g (Gouterman, 1961 – *para entender esto hay que saber teoría de grupo! Que no es necesaria para este curso*). En el modelo de Gouterman, los cuatro orbitales moleculares π entre los cuales ocurren transiciones electrónicas son los π-enlazantes a_{1u} y a_{2u}, hacia los orbitales π antienlazantes e_g (Figura 3B). La diferencia de energía (ΔE) es lo suficientemente pequeña para generar bandas de absorción en la región del visible y ultravioleta cercano del espectro electromagnético. A través de cálculos computacionales, Gouterman y colaboradores demostraron que el orbital a_{2u} tiene mayor energía que el orbital a_{1u}. Por ello a la banda Soret (400-430 nm) se asignaron transiciones a_{1u} → e_g, mientras que las bandas Q (500-700 nm) a transiciones electrónicas a_{2u} → e_g (ver Figura 3, derecha). 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 [v=0]→[v'=0] y [v=0]→[v'=1] de una transición monoeléctrica.

Años después, otros autores 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 (ver Figura 4).

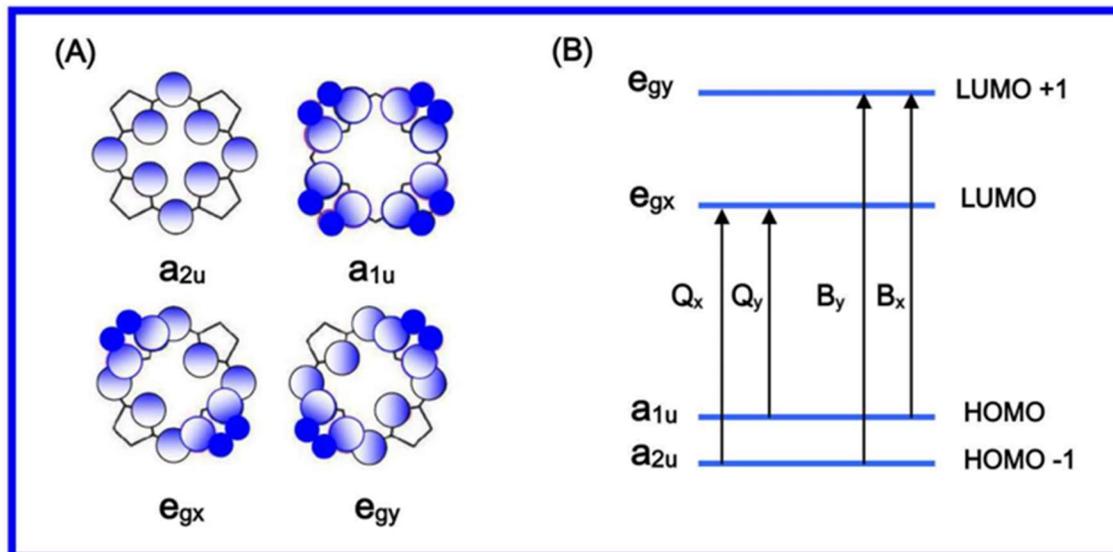


Figura 4. (A) Representación de los cuatro orbitales Gouterman en las porfirinas. (B) Esquema de niveles de energía de los cuatro orbitales de Gouterman (asumiendo simetría C_{2v}). Transiciones desde orbitales a_{1u} y a_{2u} hacia orbitales e_{gx} y e_{gy} dan lugar a las bandas Q y B, respectivamente.

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 y hacia orbitales de la porfirina (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 los orbitales cambiarán, dando lugar a espectros de absorción característicos, que permiten diferenciar el tipo de porfirina y el metal unido. 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*, *rhodo*, *oxo-rhodo* y *phyllo* (Prins et al 2001). Cuando las intensidades relativas de las bandas Q son tales que $IV > III > II > I$ (ver Figura 2), 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 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$).

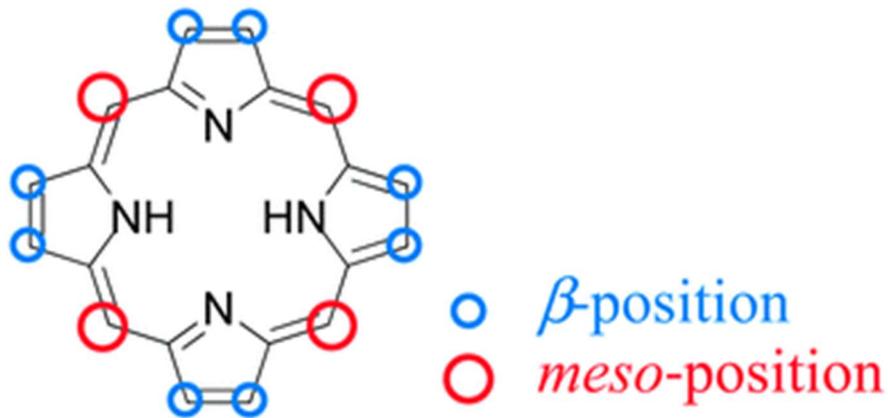
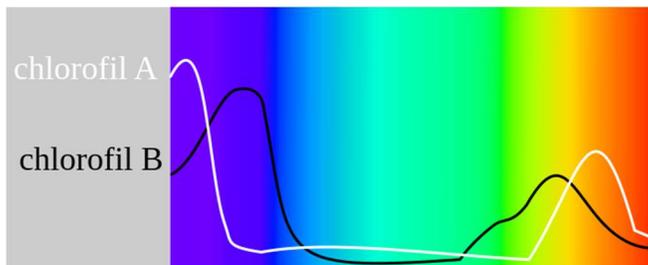
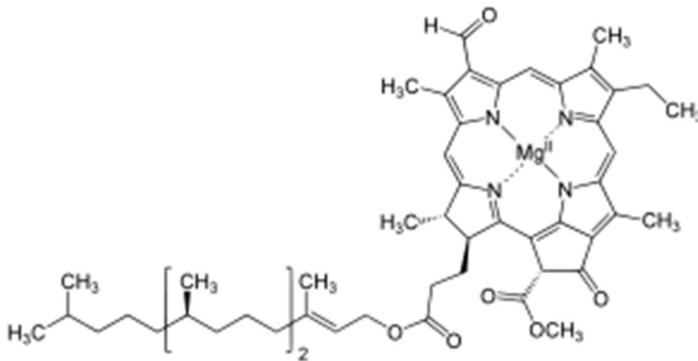


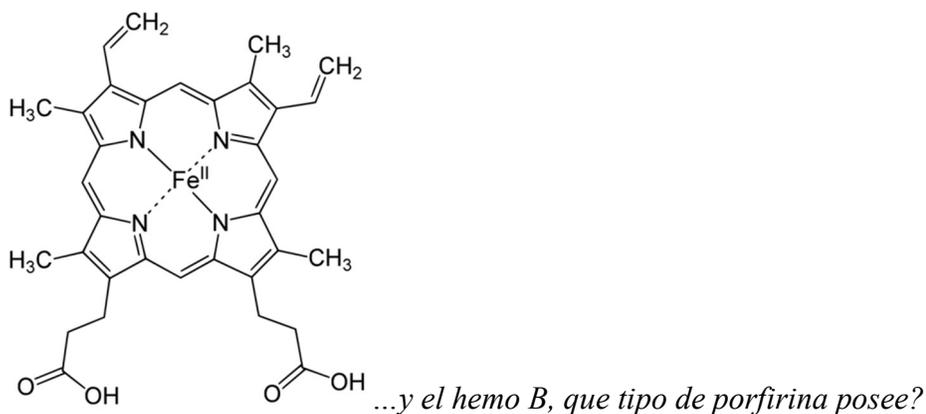
Figura 4. Localización de las posiciones beta y meso en una porfirina.

Sustituyentes con electrones π (e.g. grupos carbonilo $-C=O$, o vinilo $-CH=CH_2$) unidos directamente a las posiciones β dan un cambio en las intensidades relativas de las bandas de Q (i.e. $III > IV > II > I$). Estos dan lugar a espectros 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 (*red shift*). 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 $III > II > IV > I$. En los tres casos anteriores, las posiciones *meso* no está sustituidas.

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).



Clorofila A y B: que tipo de porfirinas son?



Sin embargo, los sustituyentes del macrociclo afectan muy poco el espectro de absorción UV-Visible cuando comparamos el efecto del metal central y su estado de oxidación, sumado a la presencia de ligandos coordinados al metal. En este sentido, cuando el macrociclo porfirínico está coordinado a cualquier metal, el patrón de bandas Q cambia, en lugar de mostrar **cuatro** bandas solo muestra **dos**. O sea, cuando se forma la metalo-porfirina el espectro de absorción UV-Visible cambia drásticamente. Las dos bandas Q que se pueden observar ahora se denominan bandas 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).

El esquema de orbitales moleculares de la porfirina sumado al del metal quedaría como se muestra en la figura 5:

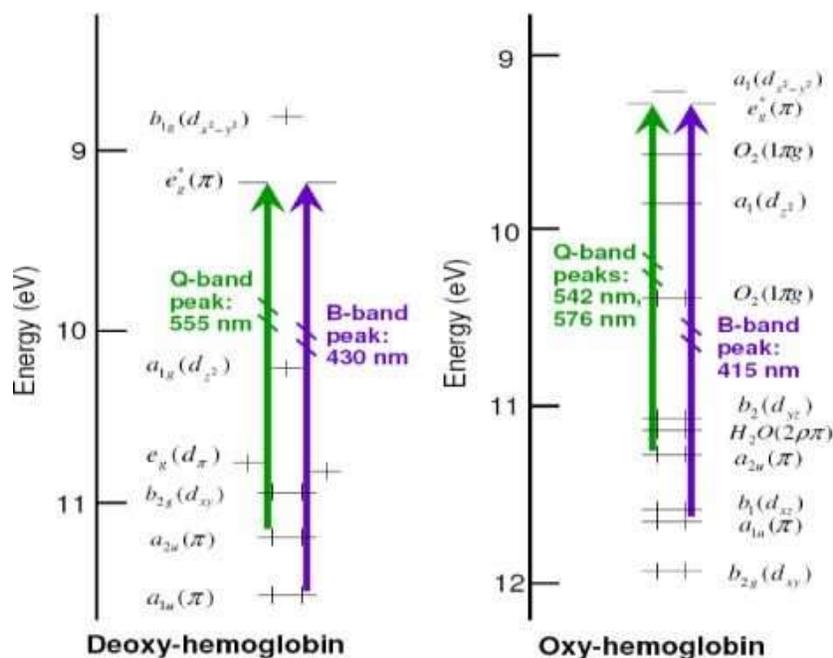


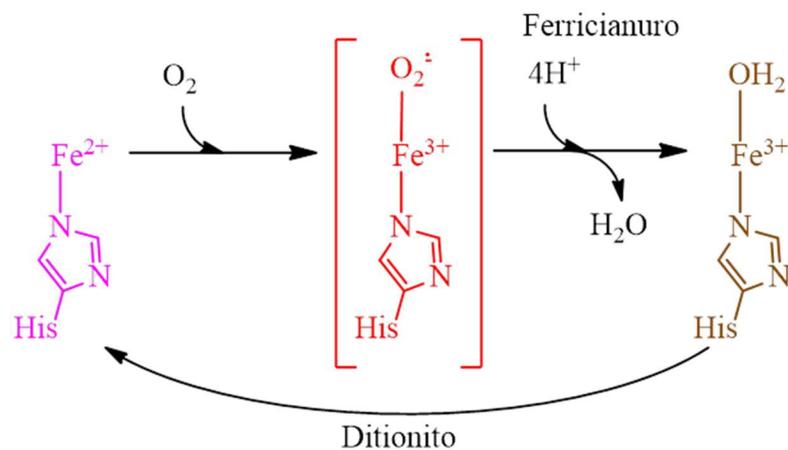
Figura 5. Diagrama de niveles de energía de los orbitales d del Fe y π de la porfirina, en la hemoglobina.

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 cc*₃).

Metodología:

- 1- Obtención de las diferentes formas de la Hb humana.
 - a. Preparar una solución de Hb humana de acuerdo al protocolo indicado por el docente. La $A_{\text{Soret}} < 1.00$, MW: 64.5 kDa.
 - b. 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.
 - c. 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.
 - d. 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.



- 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.

| | | Heme A | Heme B | Heme C | Heme O |
|-----------------|--|--|--|---|--|
| PubChem nº | | 7888115 | 444098 | 444125 | 6323367 |
| Fórmula Química | | C ₄₉ H ₅₆ O ₆ N ₄ Fe | C ₃₄ H ₃₂ O ₄ N ₄ Fe | C ₃₄ H ₃₆ O ₄ N ₄ S ₂ Fe | C ₄₉ H ₅₈ O ₅ N ₄ Fe |
| C ₃ | | CH(OH)CH ₂ Far | -CH=CH ₂ | -CH(Cys-S)CH ₃ | CH(OH)CH ₂ Far |
| C ₈ | | -CH=CH ₂ | -CH=CH ₂ | -CH(Cys-S)CH ₃ | -CH=CH ₂ |
| C ₁₈ | | -CH=O | -CH ₃ | -CH ₃ | -CH ₃ |

Deoxy-Hb: pirámide de base cuadrada / Fe(II) → 3d⁶ / campo débil → S=2 (paramagnética)

Oxy-Hb: octaédrico distorsionado / Fe(II) → 3d⁶ / campo fuerte → S=0 (diamagnética)

Met-Hb: octaédrico distorsionado / Fe(III) → 3d⁵ / campo débil → S=5/2 (paramagnética)

