

DICROÍSMO CIRCULAR

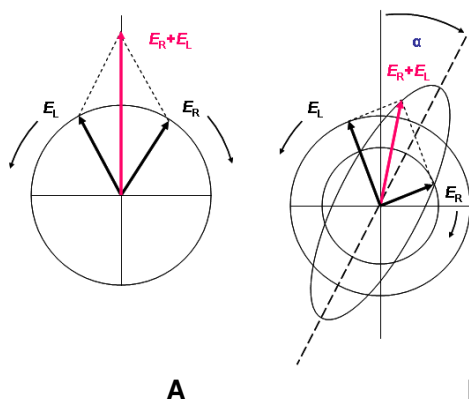
CD es una técnica espectroscópica de absorción que provee información acerca de la estructura de macromoléculas biológicas.

La señal medida en CD es la diferencia entre las Abs (A) de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda (l) y hacia la derecha (r):

$$CD = A(r) - A(l)$$

Se utiliza como fuente luz polarizada (UV-VIS) y las muestras a analizar, además de absorber, deben ser **óptica// activas**: deben ser quirales, es decir, no disponer de un plano de simetría y no ser superponibles con su imagen especular.

La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Biot y Fresnel: un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo (es decir que rota el plano de la luz polarizada), cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes en el medio. Esta interacción induce un desfaseamiento y un cambio de magnitud en ambos componentes polarizados circularmente, lo que provoca una rotación del plano de polarización en un **ángulo alfa**. La desviación en el plano de la luz polarizada se debe al cambio en el índice de refracción entre la luz polarizada circular a la izquierda y a la derecha. La distorsión de este plano genera una elipse:



(A) Los vectores de los componentes del haz antes de llegar a la muestra. (B) Esos mismos vectores después de interactuar con los solutos de la muestra, fuera de fase. La onda resultante: polarización elíptica, debido a la diferencia en absorción que presenta la molécula para cada tipo de polarización circular.

La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o *elipticidad* versus la longitud de onda.

Las medidas de CD se realizan determinando la diferencia de absorbancias entre la luz polarizada circularmente hacia la izquierda $A(l)$ y hacia la derecha $A(r)$. Teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer, que define el proceso de transición electrónica en la espectroscopia UV-VIS, se puede expresar esta diferencia de absorbancias como:

$$\Delta A(\lambda) = A_{L(\lambda)} - A_{R(\lambda)} = [\epsilon_{L(\lambda)} - \epsilon_{R(\lambda)}] \cdot l \cdot c = \Delta \epsilon \cdot l \cdot c$$

donde c es la concentración molar del soluto quiral, ϵ es el coeficiente de extinción molar y l el paso de luz.

Cuando la luz polarizada atraviesa un medio quiral, los vectores eléctricos describen una elipse cuyo eje mayor se encuentra en un nuevo ángulo de rotación. Cuando los vectores eléctricos de las dos

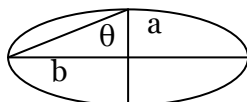
componentes circulares se encuentran en la misma dirección, la suma de sus magnitudes proporciona el eje semimayor de la elipse, y cuando están en direcciones opuestas, la diferencia de sus magnitudes proporciona el eje semimenor de la elipse. El CD se define mediante la relación entre el eje semimayor y semimenor. Esta relación es la tangente del ángulo θ , conocido como elipticidad.

Este ángulo θ generalmente es muy pequeño, por lo que puede aproximarse $\tan \theta \approx \theta$ y se relaciona con la absorbancia mediante la siguiente expresión:

$$\theta = 32,98 \cdot \Delta A$$

o expresado como elipticidad molar:

$$[\theta] = 3298 \cdot \Delta \epsilon$$



a es eje menor, b el mayor

$$\text{tg } \theta = a/b \rightarrow \theta = \text{arctg}(a/b)$$

θ vs. $\lambda \rightarrow$ espectro de CD

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación.

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β , giros y otros tipos estructurales).

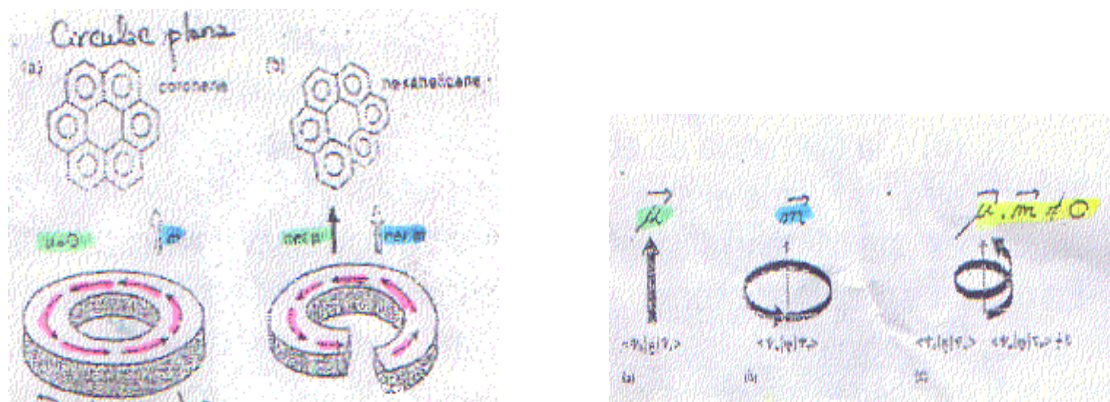
Transiciones electrónicas:

Las bandas observadas en los espectros de absorción y de CD de macromoléculas en solución corresponden principalmente a las transiciones electrónicas entre los niveles vibracionales más bajos y diversos niveles vibracionales en el primer estado excitado.

Una transición electrónica se produce porque el campo eléctrico de la radiación, el magnético o ambos inducen a los electrones a un nuevo estado de energía. El efecto del campo eléctrico es un rearrreglo lineal de los electrones llamado "momento dipolar eléctrico de la transición" y se denota por el vector $\underline{\mu}$. La dirección de $\underline{\mu}$ es la misma que la del dipolo de polarización, esto es la dirección en la cual los electrones son empujados. El campo magnético induce un rearrreglo circular de la densidad electrónica llamado "momento dipolar magnético de transición, m"

En una molécula aquiral la redistribución neta de electrones se da siempre en el plano, pudiendo ser lineal ($\mu \neq 0$; $m = 0$) o circular ($\mu = 0$; $m \neq 0$), pero también puede darse que ambos momentos sean diferentes de 0 y en este caso el rearrreglo es en una espiral. En una molécula quiral, el rearrreglo de electrones durante una transición es siempre helicoidal.

Si la hélice formada por el movimiento de electrones es hacia la derecha (dextrógira), es más fácilmente inducida por luz polarizada hacia la izquierda, y se observa una señal positiva de CD; mientras que si es hacia la izquierda, se induce más fácilmente por luz polarizada hacia la derecha, y la señal es negativa. Esto es debido a que el vector del campo eléctrico de la luz interactúa con $\underline{\mu}$, y simultáneamente el vector del campo magnético de la luz interactúa con m .



Estos dos sistemas aromáticos tienen 6 anillos fusionados, en el primero son coplanares entre sí y en el segundo, uno de los anillos está en otro plano (el anillo 1 no está unido al 6). Si se mira desde arriba, el primero sería como una dona, y el segundo como un fracción de hélice. En la molécula aquiral (la primera) hay una distribución plana de los electrones, confinada en dos planos, uno por arriba de la molécula y otro por debajo, mientras que en la quiral (la segunda), la distribución de los electrones es helicoidal. Entonces, tenemos que para el primer caso, el momento dipolar eléctrico es cero (se anulan) y el momento dipolar magnético resultante es un vector hacia arriba (por la regla de la mano derecha). En el segundo caso, tanto el momento dipolar eléctrico como el magnético son diferentes de cero. Ambos vectores están dirigidos hacia arriba. El producto escalar de $\mu \cdot m$ es también distinto a cero lo que implica que ambos vectores no son perpendiculares.

Para que una transición sea permitida en CD (para que una sustancia absorba en CD) debe inducirse una circulación helicoidal de corriente, es decir, que el producto escalar entre los momentos dipolares sea distinto de cero. Esto es lo que se conoce como las **reglas de selección de CD**.

Formas de análisis de los espectros de CD:

Para una colección de moléculas quirales, se espera observar una señal de CD si los fotones de luz que inciden sobre la muestra tienen la energía suficiente para causar la transición.

La ecuación que resume los requerimientos de paralelismo entre μ y m para un movimiento de electrones helicoidal necesario para CD es la ecuación de Rosenfeld:

$$R = \text{Im} \{ \mu \cdot m \}$$

R es la intensidad de CD para la transición en una colección de moléculas quirales orientadas al azar. Se lo conoce como la fuerza de CD o fuerza rotacional. Im significa "la parte imaginaria de".

Los métodos para el análisis de los espectros de CD son:

✓ **Métodos empíricos:** Se basan en la comparación con otros sistemas. La mayoría de las aplicaciones de CD involucran análisis espectrales cualitativos y/o empíricos. Por cualitativo se entiende que es la observación: cuando se hace determinado cambio (aumento o disminución de la T° , etc), se observa dicho cambio en el espectro de CD. Si el análisis es cuantificado midiendo el cambio en el espectro de CD en función de la concentración, temperatura, fuerza iónica, etc, y/o comparando con otro sistema relacionado (tanto espectroscópicamente como estructuralmente), entonces se trata de un análisis empírico.

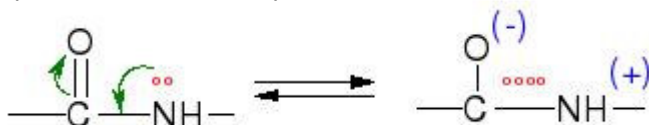
✓ **Ab initio:** Se basan en cálculos a partir de la ecuación de Rosenfeld. Estos cálculos requieren mucho trabajo para asegurar que sean confiables, y generalmente solo sirven para un determinado sistema.

✓ **Análisis Cromofórico:** La característica principal de un cromóforo como grupo funcional, es que puede ser considerado como una subunidad bien definida espectroscópicamente dentro de una molécula que es muy poco perturbada por el resto del sistema. Un cromóforo aquiral aislado no tiene CD intrínseco, por lo que se puede deducir el CD inducido en una la transición particular del medio que rodea al cromóforo. Dado que los cromóforos son aquirales, $m=0$, $\mu=0$ o μ y m son perpendiculares entre sí. La transición $m=0$, $\mu \neq 0$ se llama dipolo eléctrico permitido, dipolo magnético prohibido. La transición $m \neq 0$, $\mu=0$ es dipolo

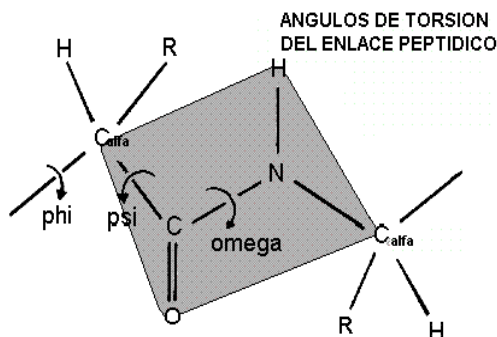
magnético permitido, dipolo eléctrico prohibido. La intensidad de CD es inducida por los dos tipos de transiciones, la primera ($m=0, \mu \neq 0$) requiere la inducción de la componente magnética, mientras que la segunda ($m \neq 0, \mu=0$), la de la componente eléctrica. Dependiendo de cual componente sea inducida se podrán determinar aspectos de la geometría de la molécula.

Cromóforo Amida:

El enlace peptídico posee una rotación limitada respecto al enlace $O=C-NH$ debido a su carácter parcial de doble enlace que resulta de la deslocalización de un par de electrones no enlazante del átomo de nitrógeno. Por lo tanto no es ópticamente activo por si mismo, pero el entorno quiral en el que se encuentra hace que pueda ser detectado por CD.



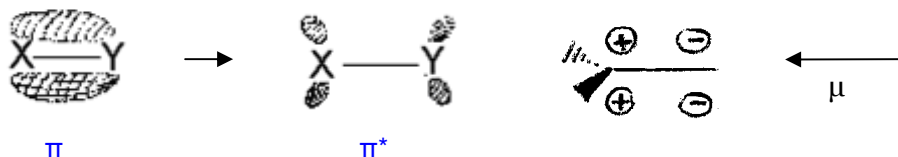
Hay dos enlaces con rotación permitida: $R-C_{\alpha}-NH$ determinado por el ángulo Φ y $O=C-C_{\alpha}-R$ determinado por el ángulo Ψ . Las diferentes estructuras secundarias que se encuentran en péptidos y proteínas se definen según los valores de estos dos ángulos diedros del esqueleto polipeptídico, por lo que son los responsables de los espectros de CD particulares de los diferentes elementos de estructura secundaria (α -hélice, lamina β , etc).



El enlace amida absorbe la luz en el UV lejano y puede experimentar dos transiciones electrónicas:

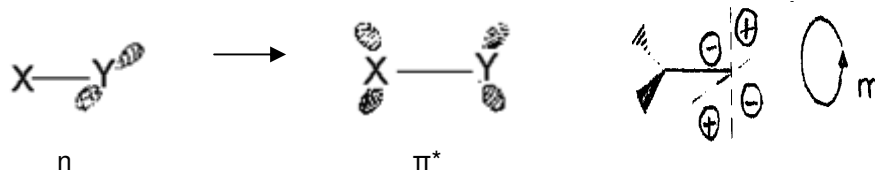
1. $\pi \rightarrow \pi^*$ Momento dipolar eléctrico

La transición tiene un momento dipolar eléctrico neto por lo que hay un desplazamiento lineal de la carga. No hay momento dipolar magnético.



2. $n \rightarrow \pi^*$ Momento dipolar magnético

La transición no tiene un momento dipolar eléctrico neto, pero sí un pequeño momento dipolar magnético por lo que hay un desplazamiento circular de la carga. (Al pasar al π^* , la carga se desplaza por encima y/o por debajo del plano \rightarrow transición rotacional)



La transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es la de mayor energía porque se pasa de un orbital enlazante a uno antienlazante y se observa como un pico positivo a 190nm; la transición $n \rightarrow \pi^*$ es de menor energía ya que se pasa de un orbital no enlazante a uno antienlazante, y se visualiza como un pico negativo centrado a 220nm

El cromóforo Fenilalanina

La cadena lateral de la Phe tiene un alto grado de simetría por lo que absorbe muy débilmente. El espectro tiene 4 bandas vibracionales que pueden ser positivas o negativas y tienen diferentes intensidades. En el espectro de CD de una proteína, la estructura vibracional de la Phe puede observarse cuando la proteína está plegada.

Debido al alto grado de simetría, la Phe tiene el menor coeficiente de extinción molar, y en consecuencia la menor fuerza rotacional de los 3 aa aromáticos. Phe es también el aa menos sensible a los cambios en el entorno debido a que la transición es insensible al cambio en la polaridad del solvente.

El cromóforo Tirosina

Es más asimétrico que la Phe, por lo que las bandas son más intensas. Las bandas vibracionales tienen todas el mismo signo.

En una proteína plegada, el espectro de absorción de este aa está compuesto por bandas anchas superpuestas, y el pico principal está a 276nm con un hombro a 283nm.

La Tyr es capaz de formar puentes de H, lo que disminuye su energía de transición del estado basal al excitado y lleva a un corrimiento del espectro hacia el rojo. La posición del pico de la Tyr puede dar indicios sobre el entorno de la misma.

El cromóforo Triptófano

El Trp absorbe mucho más intensamente que los otros aa aromáticos, sin embargo en una proteína suele haber más residuos de Tyr, por lo que la contribución de ambos al espectro suele ser similar.

El cromóforo Puente disulfuro

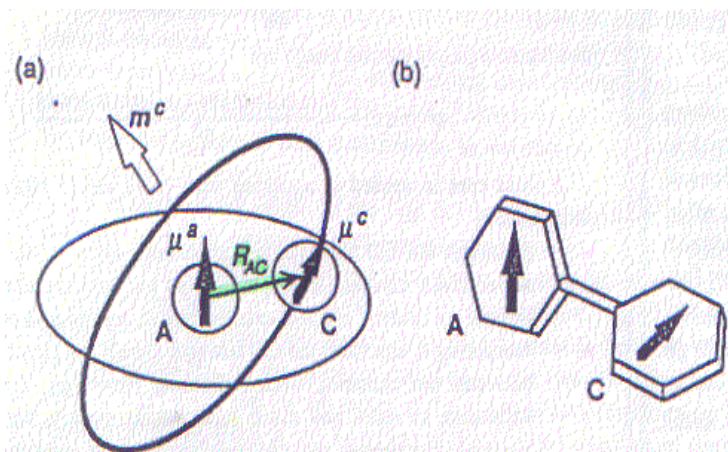
Este cromóforo resulta de la unión covalente de dos Cys de una proteína. Aunque la absorción de este enlace es débil, la intensidad de la banda en el espectro de CD puede ser fuerte. Sin embargo, la contribución al espectro de CD de este cromóforo está siempre bajo los cromóforos aromáticos.

La contribución del cromóforo disulfuro al UV cercano es un pico que puede ser positivo o negativo, entre 250 y 300nm, sin bandas vibracionales distinguibles.

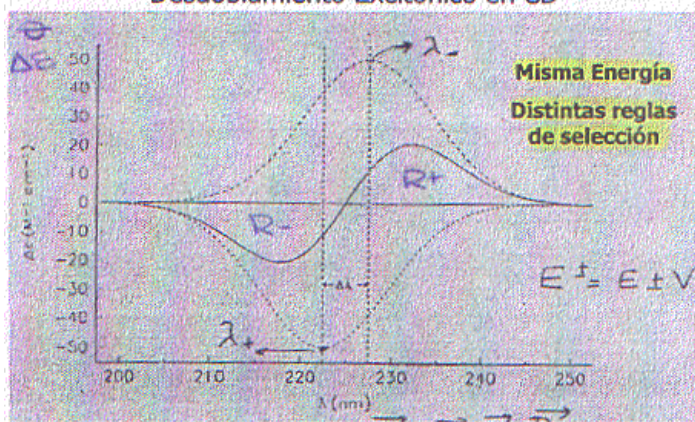
Espectro de dímeros en CD

Si dos cromóforos son idénticos o muy parecidos y están muy cerca pero no en el mismo plano, se va a ver un acoplamiento significativo en las transiciones de ambos que se dan a la misma energía (E): los μ de estas transiciones tienen igual módulo, pero distinta orientación y sentido por lo que se acoplan para dar una de las dos hélices según se encuentren en fase o desfasados, por lo que en el espectro de CD se espera observar dos picos. Las dos hélices que se formen tendrán igual magnitud, pero señal de signo opuesto en el espectro de CD y energías muy cercanas a E, por lo que se verá un espectro con dos picos, uno negativo y uno positivo.

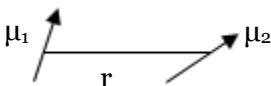
El ejemplo más simple es el de los anillos bifenilos: estos no son coplanares y dependiendo de los sustituyentes que tengan van a adoptar una orientación determinada. Los anillos A y C son idénticos, son dos cromóforos aquirales que aislados no tienen señal en CD debido a que sus momentos dipolares son perpendiculares ($\mu \cdot m = 0$). Sin embargo, el dímero AC sí va a tener señal en el espectro de CD ya que una de las componentes del momento dipolar magnético de C puede interactuar con la componente del dipolo eléctrico de transición de A y como A y C son iguales (tienen la misma energía), se produce un acoplamiento en sus momentos dipolares de transición, esto es lo que se denomina **acoplamiento excitónico**. Así se observa un desdoblamiento excitónico en el estado excitado, y en consecuencia va a haber señal de dicroísmo.



Desdoblamiento Excitónico en CD



Desdoblamiento Excitónico: es la energía de interacción entre dos dipolos. Depende del módulo, la distancia (r) y la orientación de cada dipolo:



Las energías de las dos bandas son:

$$E^{\pm} = E \pm V_{12}$$

Donde V_{12} es la energía de interacción dipolar, que en términos del espectro se denomina desdoblamiento excitónico entre los monómeros. Es normalmente el valor que sube o baja la energía, es decir la diferencia entre los dos nuevos niveles de energía.

$$V_{1,2} = \frac{\mu_1 \cdot \mu_2}{r^3} - \frac{3(\mu_1 \cdot r)(\mu_2 \cdot r)}{r^5}$$

Si la interacción entre los dipolos es atractiva, entonces V_{12} es menor que 0, si es repulsiva, es mayor. $\mu \cdot r = |\mu| \cdot |r| \cos \theta$; siendo θ es el ángulo entre el dipolo y la distancia.

- Si $\theta = 0$ (paralelos) $\rightarrow \cos \theta = 1 \rightarrow \mu \cdot r = |\mu| \cdot |r|$
- Si $\theta = 90$ (perpendiculares) $\rightarrow \cos \theta = 0 \rightarrow \mu \cdot r = 0$. Los momentos dipolares no interactúan por lo que no hay señal en CD.

Como el desdoblamiento es inversamente proporcional a la distancia (r), solo voy a ver perturbaciones cuando los cromóforos estén lo suficientemente cerca (2 a 3 Å)

El signo y magnitud de cada banda está dada por la fuerza rotacional R :

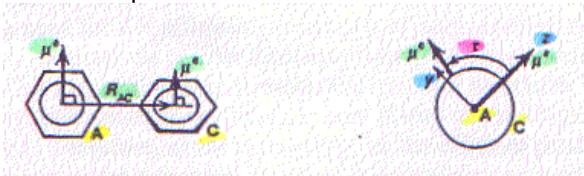
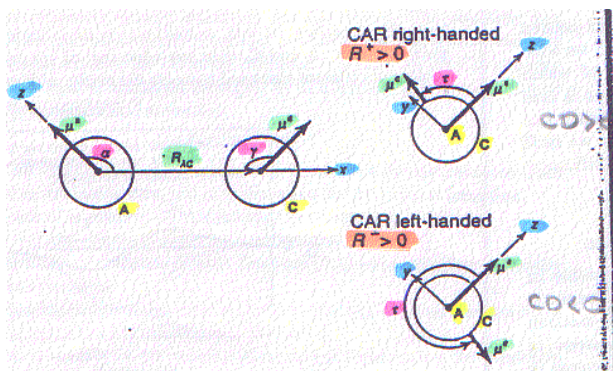
$$R^{\pm} = \pm E \mu^2 R_{AC} (\sin \alpha) (\sin \varphi) (\sin \tau) / 4h$$

Donde R_{AC} es el vector que va desde A a C, el ángulo α es el comprendido entre R_{AC} y μ^a ; φ es el ángulo entre $-R_{AC}$ y μ^c y τ el ángulo comprendido entre μ^a y μ^c . R^+ corresponde a la transición que ocurre a la energía E^+ y R^- a la que ocurre a la energía E^- .

Si $0 < \tau < 180$, los tres vectores, R_{AC} , μ^a y μ^c (CAR) forman un sistema de coordenadas a mano derecha, y entonces la señal de CD para el estado + es positiva, mientras que si $180 < \tau < 360$ los tres vectores forman un sistema de coordenadas hacia la izquierda y la señal positiva corresponde al estado -.

El espectro de CD que se obtenga para un dímero dependerá del ángulo entre los dos dipolos, es decir del valor del ángulo τ , que se define como la orientación relativa del momento magnético de un cromóforo con respecto al otro. Así se concluye que el espectro resultante depende de la conformación.

Volviendo al ejemplo de los bifenilos, donde $\alpha = \varphi = 90$, podemos hacer rotar un anillo con respecto al otro (variar τ) y observar el espectro obtenido:

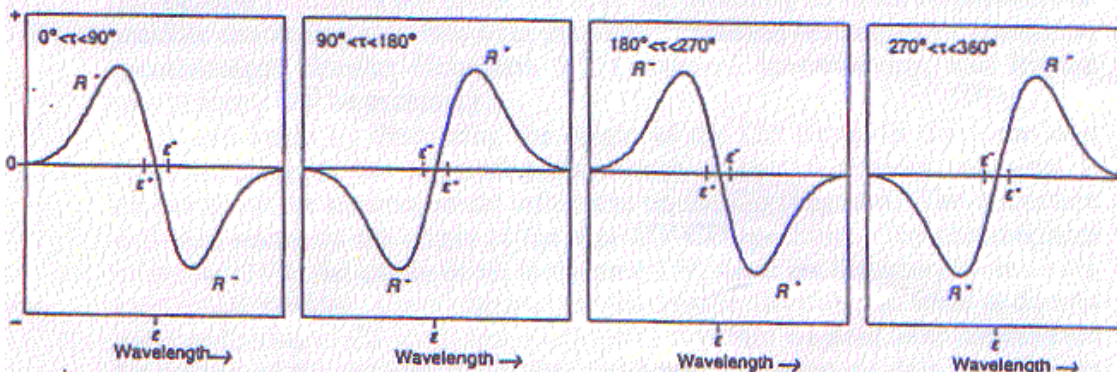


1. Si $0 < \tau < 90$

2. Si $90 < \tau < 180$

3. Si $180 < \tau < 270$

4. Si $270 < \tau < 360$



$V > 0$

$V < 0$

$V < 0$

$V > 0$

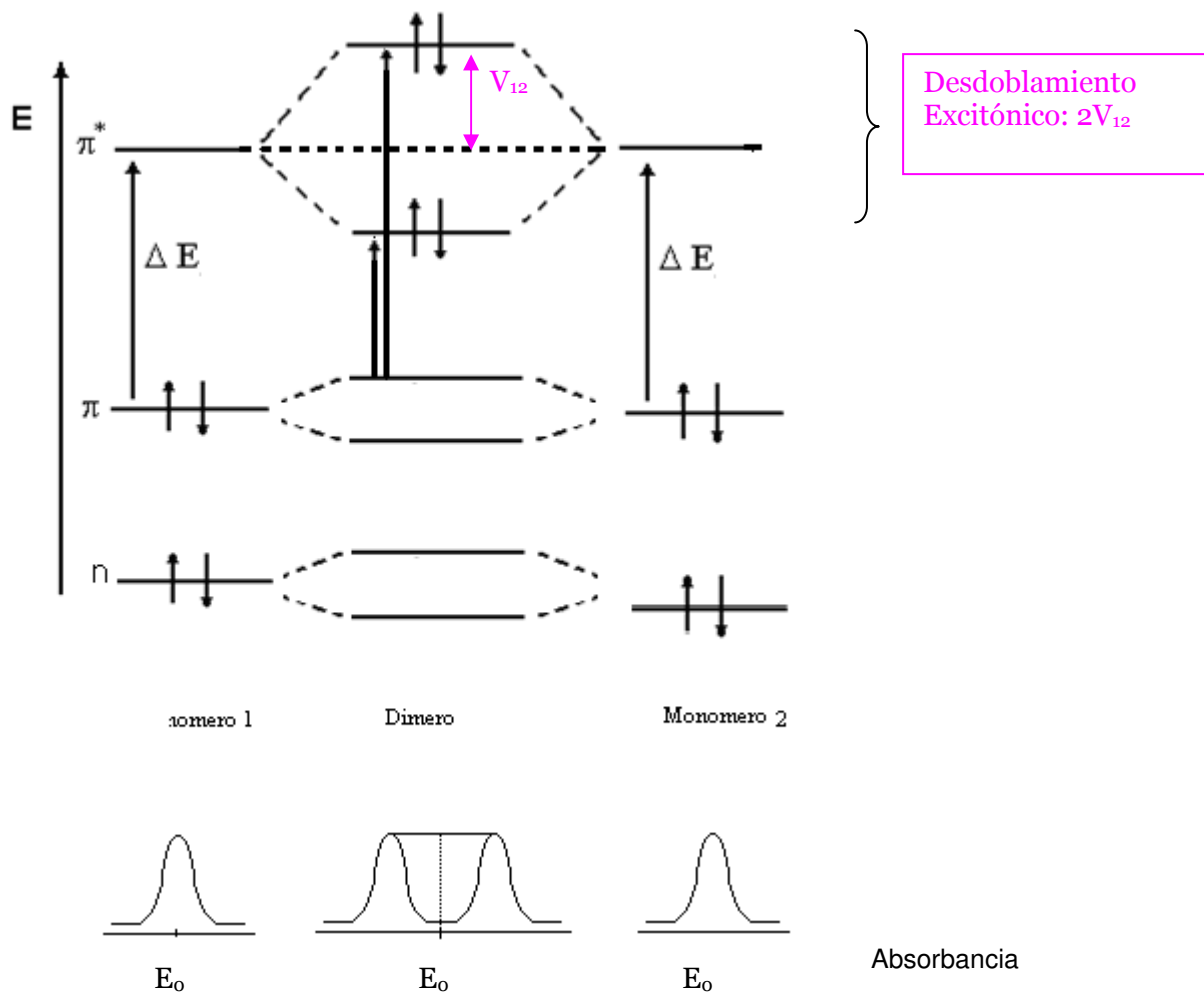
Si $\alpha = \varphi = 0 \rightarrow R^{\pm} = 0 \rightarrow$ no existe quiralidad

Si $\alpha = \varphi = \tau = 90 \rightarrow R^{\pm}$ máximo; $V = 0 \rightarrow$ CD experimental nulo

Si $\alpha = \varphi = 90$ $\left\{ \begin{array}{l} \tau = 0 \rightarrow R^{\pm} = 0 \\ \tau = 270 \rightarrow V = 0 \end{array} \right\}$ CD experimental nulo

$\tau = 45 / 135 \rightarrow$ máximo CD experimental.

Desde el punto de vista experimental, hay dos situaciones que no se pueden distinguir, el caso 1 y 3 son iguales; y el caso 2 y 4 también. Esto es debido a que tanto la señal de CD (R), como la energía, no varían al pasar de uno a otro.



Entonces, para un dímero formado por dos cromóforos interactuantes puede describirse el espectro de CD como:

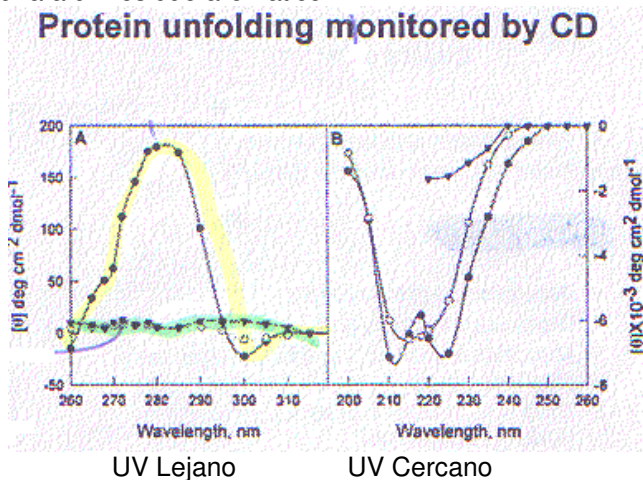
- ✓ Formado por dos bandas de igual magnitud pero de signo opuesto, R^+ centrada a E^+ y R^- centrada a E^- .
- ✓ R depende de la intensidad de las transiciones de los cromóforos aislados y de su orientación relativa y distancia.
- ✓ V_{12} tiene un valor bajo por lo que las bandas se encuentran centradas a escasa distancia y gran parte de las señales se cancelan.
- ✓ R es máximo cuando $\tau = \phi = \alpha = 90^\circ$, pero en este caso, $V_{12} = 0$ y las señales se cancelan.

Análisis de la estructura proteica usando CD:

CD es una de las técnicas más sensibles para determinar las estructuras 2rias y monitorear cambios en dicha estructura. Es el puente de unión entre la secuenciación (estruc 1ria) y las técnicas cristalográficas o RMN (estruc 3ria)

El cromóforo en el UV lejano (180 a 250nm) es el enlace peptídico; y en el UV cercano (250 a 350nm) son los residuos aromáticos, Tyr, Trp y Phe, y el pte S-S de Cys. El CD en el UV lejano permite

obtener medidas empíricas de la estructura de la proteína y su conformación. Se pueden diferenciar α -hélices, hojas β giros β y random coil. En el CD en el UV-cercano se debe constatar que la proteína tenga un espectro. La intensidad en el cercano es mucho menor que en el lejano por lo que se requiere mayor cc de proteína. Esto es debido a que en una proteína hay menos residuos aromáticos que enlaces peptídicos. Este tipo de CD depende del plegamiento de la proteína (estructura 3ria) y es como una huella dactilar de la misma en condiciones nativas (plegada). Esto implica que este método es útil para saber si la proteína está correctamente plegada. También se puede seguir el cambio conformacional provocado por algún ligando que se una a un residuo aromático.



En amarillo se observa el espectro en el UV Lejano de la proteína plegada y en verde el de la misma proteína pero desplegada o desnaturalizada. Esta última casi no tiene señal de CD debido a que como la proteína pierde su estructura secundaria, pierde su quiralidad. En el UV-Cercano se verifica que la proteína tenga un espectro, es un control cualitativo que sirve para chequear la integridad de la proteína.

En una proteína plegada o péptido el enlace amida no se encuentra aislado sino en un arreglo continuo y debido a las interacciones entre los grupos amida de las proteínas es que cambia la estructura electrónica y las propiedades espectrales. El desdoblamiento excitónico es entre los planos definidos por los enlaces peptídicos, que actúan como dímeros muy similares aunque los aa tienen distintos grupos R. Los desdoblamientos que surjan van a depender de la orientación de uno de los planos con respecto al siguiente. Si se cumplen los dos requisitos para que haya dicroísmo cuando tenemos un dímero, que ambos cromóforos estén lo suficientemente cerca y que sean muy parecidos, entonces podremos ver el espectro de CD. De acuerdo al tipo de estructura secundaria de la que se trate, se van a tener patrones de acoplamiento, distancias y orientaciones características.

La *Poly-L-Lisina* se utilizó como modelo debido a que en solución acuosa y a distintos pH adquiere diferentes estructuras secundarias.

Gráficos de CD de las estructuras secundarias

UV-Lejano

Hay dos transiciones en el UV lejano tanto para las proteínas plegadas como para las desordenadas. Una es la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ que se presenta como un pico positivo a 212 nm, y la otra es negativa a 195nm y corresponde a la $n \rightarrow \pi^*$.

✓ α -hélices:

En la estructura de hélice α la secuencia aminoacídica gira alrededor de un eje y las cadenas laterales quedan en la superficie de la hélice. Cada giro tiene una unidad repetitiva de 3.6 aminoácidos. La

hélice se encuentra estabilizada por enlaces de hidrógeno de los grupos amida, entre el hidrógeno unido al nitrógeno (electropositivo) del residuo (i) y el átomo de oxígeno (electronegativo) del residuo (i+4). Las hélices son anfipáticas; tienen una zona polar en la superficie y una zona hidrofóbica en la cara interna.

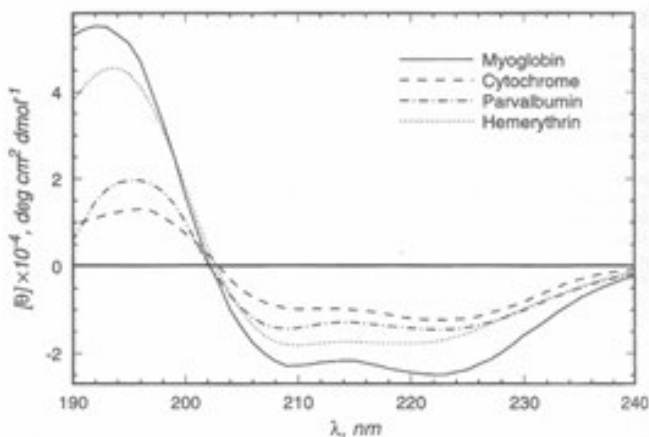


Figure 1. Representative CD spectra of all- α proteins (Veytsimov and Vasilenko, 1994).

Los espectros muestran un doble mínimo a 222nm y 208nm, y un máximo intenso a 191nm. El máximo presenta una intensidad alta debido a la asimetría intrínseca de hélice.

Las intensidades de las 3 bandas reflejan el grado de abundancia de la estructura helicoidal en la proteína.

La transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se desdobra en 2 transiciones debido al acoplamiento excitónico:

$\pi \rightarrow \pi^*_{\perp}$ máximo positivo a 191nm. Es la de mayor energía.

$\pi \rightarrow \pi^*_{\parallel}$ mínimo negativo a 208-210nm

Además, el acoplamiento excitónico de esta transición, baja la energía de la transición $n \rightarrow \pi^*$ produciendo un corrimiento hacia el rojo. Así, la transición $n \rightarrow \pi^*$ se presenta como un mínimo negativo a 222nm

✓ Lámina β :

La cadena polipeptídica está prácticamente extendida en forma de lámina. La distancia axial entre los aminoácidos es de 3.5 Å y está estabilizada por puentes de hidrógeno entre grupos NH y CO de las diferentes cadenas polipeptídicas. Las cadenas adyacentes en la hoja β pueden estar dirigidas en la misma dirección (hojas β paralelas) o en direcciones opuestas (hojas β antiparalelas).

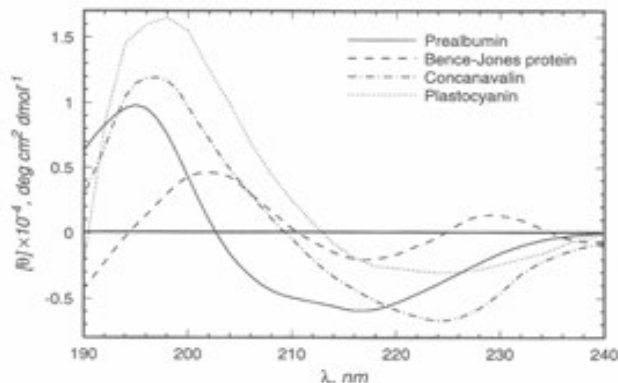


Figure 2. Representative CD spectra of all- β proteins (Veytsimov and Vasilenko, 1994).

Las proteínas con estructura 2ria mayoritariamente β presentan un máximo simple y un mínimo simple, pero sus espectros son muy variables porque las hojas pueden ser paralelas o antiparalelas y por la variación en el largo y ancho.

$\pi \rightarrow \pi^*$ banda positiva entre 190 y 200nm
 $n \rightarrow \pi^*$ banda negativa entre 210 y 225nm

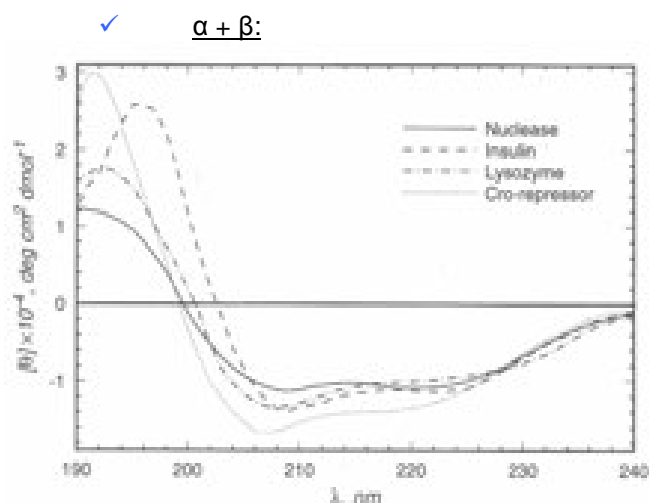


Figure 3. Representative CD spectra of $\alpha + \beta$ proteins (Votawanson and Vasilevski, 1994).

En las proteínas que son mezcla de 2 dominios: α y β separados, generalmente predomina la forma del espectro de la α hélice, ya que esta es intrínsecamente asimétrica. Sin embargo, la intensidad del máximo es mucho menor que en el espectro de la hélice sola.

$\alpha + \beta$ significa que la proteína tiene ambos dominios, pero bien diferenciados en el espacio: primero un dominio α y luego uno β , o al revés.

$n \rightarrow \pi^*$ banda negativa a 222nm (mínimo)
 $\pi \rightarrow \pi^*$ banda negativa a 208-210nm (mínimo)
 $\pi \rightarrow \pi^*$ banda positiva a 190-195nm (máximo)

La banda a 208-210nm tiene mayor intensidad que la de 222nm $\rightarrow \theta_{210} > \theta_{222}$

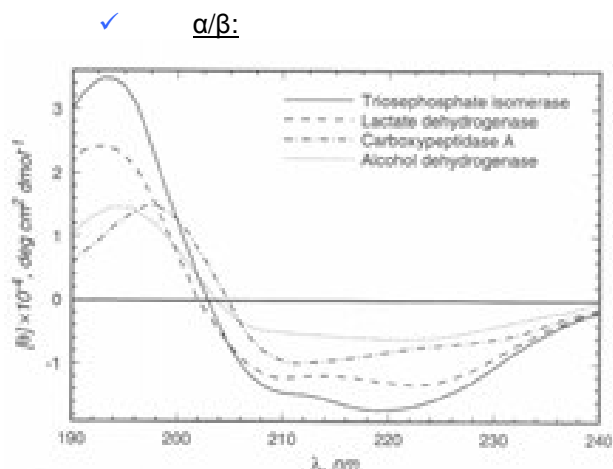


Figure 4. Representative CD Spectra of α/β proteins (Votawanson and Vasilevski, 1994).

α/β significa que la proteína tiene una mezcla de los dos dominios.

El espectro es similar al anterior. La diferencia es que la banda a 222nm generalmente tiene mayor intensidad que la banda a 208-210nm. $\rightarrow \theta_{210} < \theta_{222}$

✓ Random Coil:

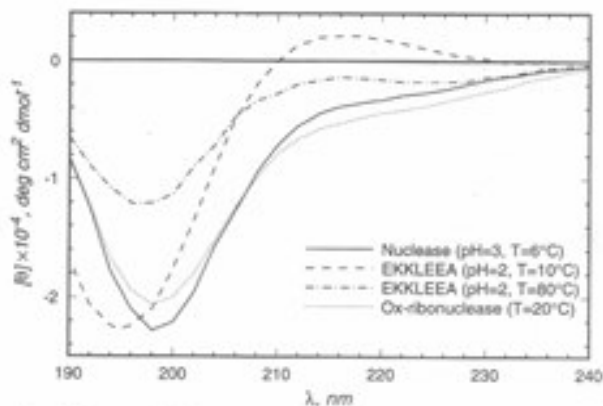
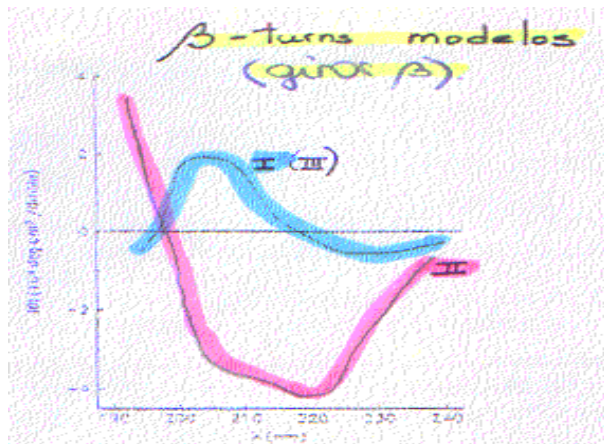


Figure 5. Representative CD spectra of unordered proteins (Vasyunin and Vasilenko, 1994).

Para las proteínas sin estructura ordenada (oligopéptidos, polipéptidos cortos con puentes disulfuro o grupos prostéticos y proteínas desnaturalizadas) se observa un mínimo intenso a 200nm y puede haber algunos máximos o mínimos débiles por encima de 210nm debido a las partes de la proteína plegadas al azar.

✓ Giros β :

Los giros β se producen cuando la cadena peptídica cambia bruscamente y, generalmente se encuentran en zonas superficiales de las proteínas. En el giro β están involucrados cuatro residuos que están formando un ángulo de 180 grados.



Los giros β tienen un espectro bien definido, sin embargo son difíciles de observar en el espectro global.

El espectro de los giros β tipo I se parece al de las hélices α en la región del UV 210 a 220 nm, pero la banda positiva a 190 es más débil. Los giros β tipo II originan un espectro similar al de la hoja β , pero corrido al rojo entre 5 y 10nm. En ciertas circunstancias los giros tipo I pueden dar un espectro similar al del tipo II.

Las transiciones características de un giro β son las $n \rightarrow \pi^*$ que muestran una banda negativa débil a 220-230nm y la $\pi \rightarrow \pi^*$ que muestra una banda positiva a 220-210nm y una negativa a 180-190nm.

El espectro en el UV-lejano se puede suponer como la suma de los espectros componentes de la estructura 2ria:

$$\theta_t = x_\alpha \theta_\alpha + x_\beta \theta_\beta + x_c \theta_c$$

Siendo θ_t la elipticidad experimental corregida, x un factor que se calcula a partir de la estructura terciaria de la proteína obtenida por cristalografía de rayos X, y θ son los espectros de cada tipo de estructura, hélices α , laminas β y random coil. El segundo término presenta un error intrínseco ya que la estructura β se puede perder debido a la gran variabilidad en los espectros de las hojas beta y el tercer término presenta un error entre el 5 y 10%, debido a que se pierden los giros β .

Cuando se tienen una proteína en estudio no conocida, con CD solo puedo saber el porcentaje de estructura secundaria que presenta. Por medio de algoritmos se ajustan los espectros de proteínas conocidos al nuestro y se obtiene el % de cada estructura 2ria componente de la proteína, y una supuesta estructura 3ria que luego se debe corroborar por medio de otras técnicas. Por otro lado, comparando con otras proteínas de estructura conocida se puede predecir la ubicación de esas estructuras secundarias.

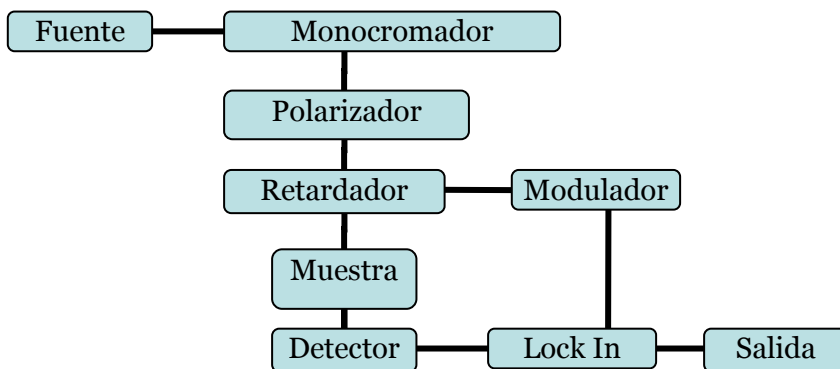
Para poder estimar la estructura secundaria hay que tener en cuenta las siguientes **suposiciones**:

- ✓ Las estructuras tridimensionales obtenidas por métodos como cristalografía de rayos X se retienen en solución acuosa (ya que x se calcula con la estructura cristalográfica, y además porque las estructuras de referencia se obtienen por este método). (*valido*)
- ✓ La combinación de los distintos elementos estructurales 2rios individuales se suman para dar el espectro de CD, y la estructura 3ria no influye. (*no valido*)
- ✓ Al espectro de CD en el UV-lejano solo contribuye el cromóforo peptídico y no los AA aromáticos y demás cromóforos no peptídicos. (*no valido*)
- ✓ Cada elemento estructural (α -hélice, hoja β , etc) se describe como un simple espectro de CD, y el efecto de variabilidad geométrica se asume como despreciable. (*no valido*)

Instrumentación:

La característica más importante de un **Espectropolarímetro** de Dicroísmo Circular, es que debe contar con una fuente de luz polarizada. La fuente es inmóvil, y debe ser lo más intensa posible de forma de minimizar los ruidos. Generalmente es luz monocromática. La luz polarizada circularmente puede ser construida a partir de dos haces de luz polarizada linealmente que tengan la misma magnitud pero que estén fuera de fase una respecto a la otra. La luz pasa a través de un polarizador lineal que esta orientado a 45° del retardador de onda. Se elige un retardador de espesor tal que los dos haces emergentes estén desfasados en $\pi/2$ cuando lo atraviesen, de manera que ambos constituyan luz circularmente polarizada hacia la derecha. Si el polarizador se rota 90° , la luz es circularmente polarizada hacia la izquierda.

La luz polarizada pasa por un modulador fotoelástico que consiste en un material que se comprime y expande para producir radiación circularmente polarizada (generalmente un cristal de seleniuro de zinc) la cual incide sobre la muestra bajo estudio, colocada en una celda con ventanas de materiales estables. La radiación que emana de la celda pasa a un detector que proporciona los espectros de dicroísmo circular.



Aplicaciones y usos de CD:

- ✓ Determinación de la estructura 2ria de proteínas que no pueden ser cristalizadas.
- ✓ Estudio de ligando
- ✓ Estudio de cambios de entorno: pH, agentes desnaturalizantes, T, solventes, etc.
- ✓ Determinación de estructuras 2rias de proteínas de membranas (difíciles de cristalizar) y dentro de vesículas lipídicas (in vivo)
- ✓ Estudio de interacciones proteína-proteína y ácidos nucleico-proteína
- ✓ Estudios de aspectos estructurales de: ácidos nucleicos, polisacáridos, péptidos, hormonas y otras moléculas pequeñas.

Ventajas:

- ✓ Experimento simple, rápido y no destructivo.
- ✓ Requiere menores cc q las precisadas para RMN.
- ✓ Escala de t menor que RMN. Puede servir para el estudio de una interacción ligando-MM, en donde el L tiene un muy corto t de residencia
- ✓ Se usa para cualquier tamaño de molécula.
- ✓ Es el complemento de técnicas más detalladas y precisas (Cristalografía y RMN)

Limitaciones:

- ✓ La deconvolución de un espectro en 4 o 5 componentes que no varían de proteína a proteína puede ser una sobre simplificación.
- ✓ Los espectros de referencia de prot 100 % α -hélices no se pueden comparar con espectros de prot que solo tengan una fracción de α -hélices (la intensidad aumenta con la longitud de la hélice)
- ✓ Las bandas del UV-cercano puede contribuir al espectro en el UV-lejano.
- ✓ Las formas de las curvas en el UV-cercano dependen de la estructura 2ria y 3ria.

Fuentes de error:

- ✓ Desviaciones y distorsiones en los espectros de estructuras típicas, sobre todo en las laminas β q tienen espectros muy variables
- ✓ La absorción de los aromáticos y ptes disulfuro.
- ✓ Error al suponer que no hay interacción entre las estructuras 2rias (regla de aditividad)
- ✓ Absorción del solvente: Hay que trabajar con buffers muy diluidos y que no absorban a menos de 200nm

Consejos para obtener buena información a partir del espectro de CD:

- ✓ Primero es necesario correr un espectro de absorbancia normal para verificar que los valores de absorbancia mantengan linealidad según la Ley de Beer y ver el rango de λ .
- ✓ Toda la luz que llegue a la celda debe pasar a través de la muestra, no debe reflejarse en las paredes o base de la celda.
- ✓ Generalmente se usan cubetas cilíndricas ya que estas tienen menos birrefringencia (línea base de CD) y además usan menor cantidad de muestra. Sin embargo, las celdas rectangulares son más económicas y pueden usarse para espectroscopia de absorbancia por lo que el CD y el espectro estándar se pueden hacer a partir de la misma muestra. Además en estas últimas se pueden hacer titulaciones seriadas ya que en un principio puede llenarse un 60% de la cubeta y luego ir agregando gradualmente.
- ✓ Se debe tomar el espectro de la línea base con el solvente o buffer y luego sustraerlo al de la muestra para poder obtener el gráfico final.
- ✓ El espectro de CD generalmente escanea de λ de mayor a menor, por lo que se debe seleccionar un rango de λ que comience al menos 20nm más allá que el que abarca la absorbancia normal.
- ✓ La concentración de la muestra debe ser tal que los valores de absorbancia estén entre 0,2 y 1,5. Cuando es mayor a 2 la señal de CD no es confiable. El valor óptimo de absorbancia es 1,1. Para valores mayores, se debe verificar que la señal de CD sea proporcional a la cc de la muestra corriendo un espectro con una muestra diluida.
- ✓ Evitar buffer que absorban. Tengo que usar buffers que sean transparentes (fosfatos, boratos, Tris)
- ✓ Trabajar con bajas cc de fuerza iónica.

- ✓ Evitar turbidez. Muchas veces lo que se hace es filtrar la muestra con filtros de 50 micras antes de ponerla en la cubeta para medir CD.

Comparación de CD con UV-VIS:

El dicroísmo circular y la espectroscopia UV-vis son técnicas de espectroscopia de absorción electrónica basadas en el mismo proceso, el cambio de configuración electrónica molecular del estado fundamental a un estado excitado debido a la absorción de radiación electromagnética. En el caso del UV-vis se utiliza como fuente luz no polarizada, mientras que en los procesos dicroicos la luz está polarizada.

En la forma de espectroscopia más simple, la absorción, se mide cuanta luz de una dada frecuencia es absorbida por una colección de moléculas. Para que una sustancia absorba es necesario que cambie el momento dipolar de la transición.

El dicroísmo circular mide la absorción diferencial de la luz polarizada circularmente hacia la derecha y hacia la izquierda. Como en CD se realiza una resta, se pueden obtener picos positivos y picos negativos, lo que permite ganar resolución. Así el CD tiene poca intensidad pero alta resolución.

Cuando se produce la interacción entre 2 monómeros, se tiene un desdoblamiento excitónico de distinta energía. En **UV-vis** se obtienen 2 picos simétricos respecto de donde estaría la transición (E_0) del monómero, sin embargo que se pueda ver o no depende de la orientación de los dipolos. Así, si D^+ o D^- es = 0, o si la intensidad de uno de los picos es mayor que la del otro, entonces un pico no se verá, y parecerá que solo ha ocurrido un corrimiento al azul o al rojo dependiendo del caso. En **CD**, esto no ocurre. Si bien el V_{12} es el mismo que en UV-vis, ya que la muestra tiene las mismas transiciones, lo que cambian son las *reglas de selección*:

- ✓ Una componente es positiva y la otra negativa.
- ✓ La intensidad de cada uno ya no depende del dipolo de transición, sino de una fuerza rotacional R^+ y R^-
- ✓ La intensidad de R^+ es la misma que la de R^- .
- ✓ En CD aparecen siempre las 2 componentes.