

ESTUDO DAS INTERAÇÕES EM FASE AQUOSA DE HISTIDINA E SAIS EM DIFERENTES pH

Palavras-Chave: HISTIDINA, SAIS, DLS

Autores(as):

MATHEUS BORGES PEREIRA, FEQ – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. MARISA MASSUMI BEPPU (orientadora), FEQ – UNICAMP

GABRIELA PEREIRA DE FREITAS (coorientadora), FEQ – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A interação entre sais e materiais poliméricos formados a partir dos aminoácidos exerce funções fundamentais nos processos bioquímicos essenciais para a vida na Terra. São responsáveis pela estabilização dos ácidos nucleicos e proteínas, fotossíntese, reações catalíticas (BERTINI; SIGEL, 2001; DUDEV; LIM, 2014; L. NELSON; M. COX, 2014) e desempenham papel essencial na alta seletividade iônica apresentada por certas membranas, como os canais de Shaker. Estes apresentam seletividade de 1000:1 do íon de potássio sobre o de sódio (RUAN; RODGERS, 2004). Isto ocorre principalmente devido às interações cátion- π entre o íon e a parcela de tirosina comumente encontrada no resíduo Gly-Tyr-Gly, presente em abundância nas moléculas que compõe o canal (RUAN; RODGERS, 2004).

Essas interações entre compostos proteicos são fundamentais em diversas doenças, dentre elas destaca-se o Alzheimer (EJAZ; WANG; LANG, 2020). Essa doença degenerativa, predominante na população idosa, embora não seja patologia completamente desvendada, está intimamente associada à deposição extracelular do peptídeo amiloide-beta ($A\beta$), sendo essa deposição relacionada especialmente por altas concentração de cobre, com a geração de placas de $A\beta$ (EJAZ; WANG; LANG, 2020; IAVORSCHI, 2022).

Destarte, torna-se importante o estudo aprofundado dos mecanismos e natureza das interações entre íons e proteínas em solução aquosa. Porém devido à alta complexidade destes biopolímeros, propôs-se neste estudo a caracterização de tais interações, porém com aminoácidos, já que estes são as unidades monoméricas daqueles. A afinidade dessas interações foi analisada avaliando o tamanho das partículas formadas em solução após atingir o equilíbrio termodinâmico, por meio de uma análise de Dynamic Light Scattering (DLS).

Dentre os possíveis aminoácidos e sais a serem estudados, selecionaram-se aqueles de maior relevância biológica, baseando-se também na série de Hofmeister (HOFMEISTER, 1888). Este trabalho investigou as interações específicas entre o aminoácido histidina (His) e os sais cloreto de sódio ($NaCl$), cloreto de amônio (NH_4Cl) e cloreto de cobre (II) ($CuCl_2$). A histidina foi selecionada devido ao seu anel imidazol, que contém um sítio rico em elétrons, possibilitando interações cátion- π , amplamente estudadas (RUAN; RODGERS, 2004), sendo também escolhido pois está presente como cadeias laterais na estrutura do peptídeo $A\beta$ (CHEN et al., 2017). Além disso, foram avaliados os efeitos do pH da solução e da concentração de sal sobre as afinidades de interação entre o aminoácido e os íons.

METODOLOGIA:

As soluções aquosas foram preparadas pela dissolução em água deionizada Milli-Q® (18,2 M Ω ·cm) de quantidades precisas dos reagentes L-Histidina (Dinâmica®, Brasil), $NaCl$ (Sigma-Aldrich®, EUA), NH_4Cl

(Sigma-Aldrich®, EUA) e $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich®, EUA). As misturas de L-Histidina e sais foram ajustadas para proporções molares de 1:1 e 1:2, alcançando uma concentração final de aminoácido igual a 0,2 mmol/L por meio de diluições apropriadas. Após a preparação, as soluções foram armazenadas em geladeira por um período mínimo de uma semana antes das análises, para garantir o equilíbrio do sistema.

De posse das soluções em diversas concentrações, realizou-se o ajuste do pH das mesmas por meio da adição de soluções de NaOH e HCl, ambas soluções de 0,1mol/L. As soluções foram ajustadas para três valores de pH: 4, 7 e 9, permitindo a observação do comportamento das partículas em uma ampla faixa, incluindo condições ácidas, neutras e básicas. A medição do pH foi realizada com um pHmetro DM-22 (Digimed, Brasil) com precisão da segunda casa decimal. O ajuste do pH foi conduzido com cautela para minimizar a interferência dos íons em solução. Para isso, foi utilizado um ácido cujo ânion já está presente nos sais, evitando a adição de um novo íon. A quantidade de ácido ou base adicionada foi cuidadosamente controlada utilizando micropipetas, e a adição foi realizada gota a gota. O volume total adicionado foi registrado para possibilitar uma avaliação detalhada da sua influência no sistema.

Para a análise de espalhamento dinâmico de luz, inicialmente foram determinados os espectros de absorvância no intervalo de 200 a 800 nm e o índice de refração das soluções. A absorvância foi medida utilizando um espectrofotômetro Genesys 6 (Thermo Electron Corporation, EUA), enquanto o índice de refração foi obtido com um refratômetro R2 mini (Reichert, EUA). As análises de DLS foram então realizadas em quintuplicatas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Inglaterra) equipado com um laser He-Ne de 633 nm.

Os dados de diâmetro hidrodinâmico foram avaliados usando o software Zetasizer Software versão 6.20 (Malvern, Worcestershire, Inglaterra). E as análises de variância (ANOVA) deste trabalho foram realizadas utilizando-se o software Origin 2018 (OriginLab Corporation, EUA), considerando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

A obtenção das distribuições de população zwitteriônicas para cada pH foi obtida a partir da solução das equações de Henderson-Hasselbach (Equação 1 (HASSELBALCH, 1916)). E os resultados foram então utilizados para a discussão das interações majoritariamente presentes em solução.

$$pH = pK_a + \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad (1)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Embora seja conhecida a existência dos efeitos específicos de íon que descrevem a alteração causadas por íons específicos quando em sistemas aquosos (GREGORY et al., 2022), é primordial provar que tal alteração é observável na técnica adotada. As Figuras 1 a 3 apresentam uma distribuição de intensidade de DLS para cada composição de solução em diferentes pH.

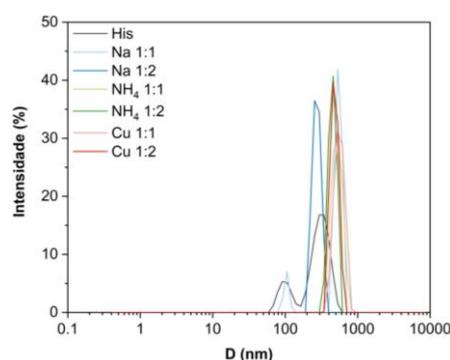


Figura 1- Intensidade de espalhamento de luz de soluções de L-Histidina e sais em pH 4

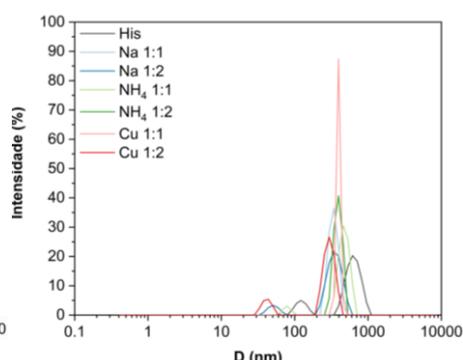


Figura 2- Intensidade de espalhamento de luz de soluções de L-Histidina e sais em pH 7

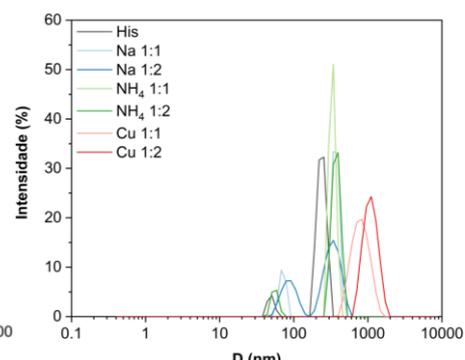


Figura 3- Intensidade de espalhamento de luz de soluções de L-Histidina e sais em pH 10

Para todos os pH estudados, pode-se observar uma perturbação do sistema após a adição do sal à solução. Isto é evidenciado pois em toda a faixa de pH a L-Histidina pura apresentou dois picos relevantes à análise, no entanto para a maior parte dos sistemas com sal, foi possível observar que somente um pico relevante foi observado. Esta mudança pode ser atribuída a dois comportamentos, um deslocamento de equilíbrio ou a uma formação de novos aglomerados/complexos. No caso da primeira espera-se observar a diminuição de um dos picos da histidina pura e o aumento de outro. Já para o segundo caso espera-se a formação de sinais de intensidade estatisticamente diferente dos originais.

A Tabela 1 apresenta os resultados da análise de variância realizada com 3 parâmetros: o pH, o sal e a concentração de sal. Desta pode-se afirmar que tanto os fatores independentes, quanto a interação destes são estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para os resultados obtidos. O comportamento do diâmetro hidrodinâmico das partículas em função das variáveis é apresentado nas Figuras 5 a 7. Já a Tabela 2 indica as populações de zwitterions de histidina obtidas para cada pH.

Tabela 1- Resultados da ANOVA de três fatores

	GL	Soma dos quadrados	Média quadrada	F valor	P valor
Sal	2	721903,067	360951,534	56,377	0
Conc. Sal	2	185378,946	92689,473	14,477	$2,80 \cdot 10^{-6}$
pH	2	47895,320	23947,660	3,7404	0,02697
Sal*Conc. Sal	4	415841,293	103960,323	16,238	$2,21 \cdot 10^{-10}$
Sal*pH	4	$1,18 \cdot 10^6$	293835,315	45,894	0
Conc. Sal*pH	4	$1,15 \cdot 10^6$	286408,887	44,734	0
Sal*Conc. Sal*pH	8	736665,742	92083,218	14,382	$5,46 \cdot 10^{-14}$

Tabela 2- População do aminoácido em diferentes pH

pH	Carga +2	Carga +1	Carga 0	Carga -1
4	0,65%	98,37%	0,98%	0,00%
7	0,00%	9,04%	90,35%	0,61%
10	0,00%	0,00%	10,51%	89,49%

A importância das informações contidas na Tabela 2, reside no fato de que a diferença na carga líquida do aminoácido influencia diretamente no tipo de interação majoritariamente esperada com o sal. Em cargas positivas, por exemplo, esperasse que a contribuição do cátion seja majoritariamente repulsiva, já que este também possui carga positiva. Em configurações onde o zwitterion neutro predomina, esperasse que o cátion interaja majoritariamente com o anel imidazol do aminoácido, já que lá encontra-se a maior concentração de elétrons. Já na sua forma de carga líquida negativa, uma interação entre o cátion e o grupo de ácido carboxílico é o efeito predominante esperado. A Figura 4 apresenta as formas zwitteriônicas e os pKa dos grupos funcionais envolvidos no respectivo equilíbrio.

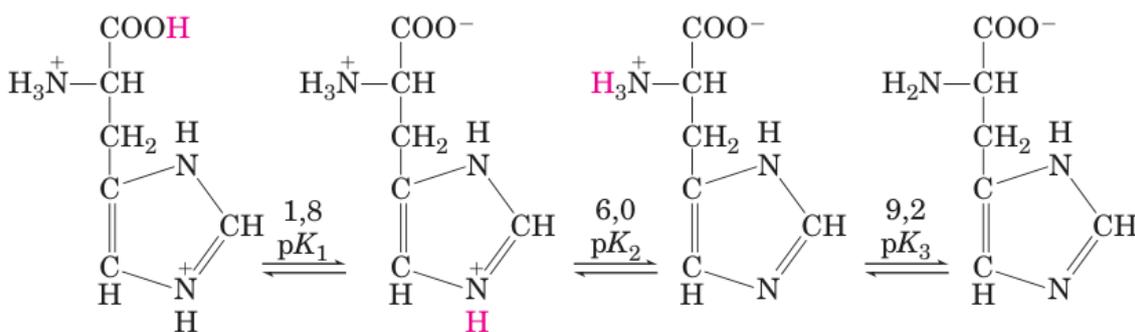


Figura 4- Formas zwitteriônicas da L-Histidina

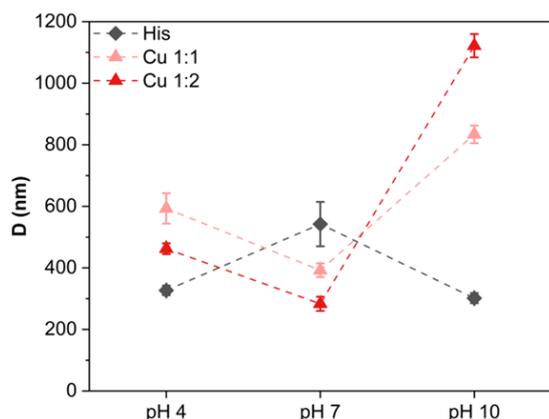


Figura 5- Diâmetro médio de partícula em relação ao pH para soluções com CuCl₂

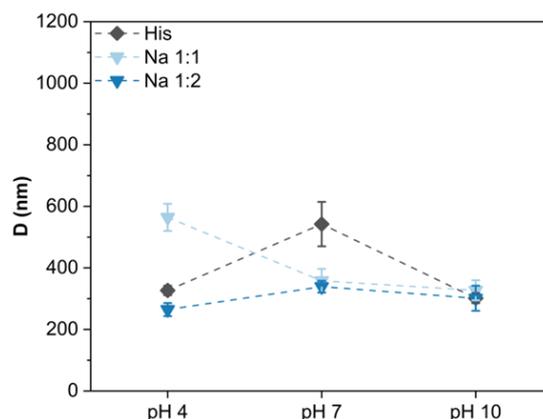


Figura 6- Diâmetro médio de partícula em relação ao pH para soluções com NaCl

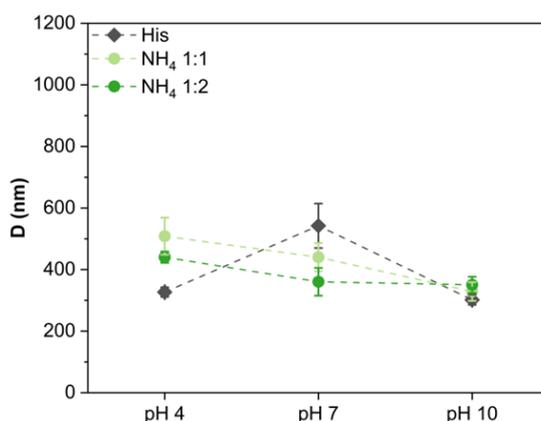


Figura 7- Diâmetro médio de partícula em relação ao pH para soluções com NH₄Cl

No geral, em meio ácido houve o aumento do tamanho das partículas mais pronunciado para a proporção 1:1. Em um pH neutro, uma diminuição, para ambas as proporções, e, em um pH básico, os dados são muito próximos ao sistema com somente aminoácido, exceto para a solução com CuCl₂. Houve um aumento perceptível do tamanho das partículas no sistema com CuCl₂ em pH básico. Outro comportamento anômalo observado foi a ausência de variações significativas no diâmetro médio para a solução de NaCl 1:2 em pH ácido.

O aumento do diâmetro médio em pH ácido pode ser explicado pelo aumento da repulsão eletrostática, uma vez que a histidina se encontra majoritariamente com carga +1, conforme indicado na Tabela 2. Em pH neutro, os aminoácidos estão predominantemente sem carga, embora uma pequena fração (9%) apresente carga +1, o que reduz a repulsão eletrostática. O cátion dos sais pode interagir com o anel imidazol dos aminoácidos, formando agregados menores do que aqueles gerados pela interação entre os próprios aminoácidos. Essa interação explica a redução do diâmetro médio em pH neutro.

O fenômeno do aumento das partículas na solução básica de CuCl₂ é observado pois, em contraste aos outros sais, o cátion de cobre formado quando em solução apresenta valência 2+. Desta forma, conforme proposto por Mesu et al. (2006) e Shtyrlin et al. (2012) o cátion interage com dois aminoácidos com carga negativa simultaneamente, formando então um complexo. Segundo os dados aqui obtidos e a hipótese de mecanismo de interação anteriormente citada, propõe-se que esses complexos formados geram aglomerados maiores do que aqueles resultantes da interação entre moléculas de histidina.

Já para o comportamento observado para as soluções de NaCl em pH ácido não foi possível encontrar elucidaciones na literatura e, portanto, são necessários mais experimentos para desvendar o mecanismo que rege essas interações.

CONCLUSÕES:

Desta forma, pode-se afirmar segundo a análise ANOVA, que para todos os sistemas não somente o sal, sua concentração ou o pH influenciam os resultados, mas sua combinação também é importante. Em pH ácido, observou-se um aumento no tamanho das partículas; em pH neutro, houve uma diminuição; e em pH básico, o cobre aumentou significativamente o tamanho das partículas. Quanto à proporção de aminoácido e sal, a proporção 1:2 resultou em partículas menores do que a proporção 1:1, exceto em pH básico. Considerando a combinação dos fatores, em pH próximo ao biológico, todos os sais diminuíram o tamanho dos aglomerados de L-Histidina. Para os sais de amônio e cobre, essa diminuição foi significativa apenas na proporção 1:2, enquanto para o sódio, ambas as proporções apresentaram uma redução significativa no tamanho das partículas.

Conclui-se também que, em pH mais altos, somente o cobre apresentou efeito de aumento dos aglomerados em solução. Tendendo então causar a precipitação dos aminoácidos caso a interação ocorra em meios mais básicos, pois caso as partículas tornem-se muito grandes é natural que a solvatação destas não possa ocorrer.

Por fim percebeu-se um comportamento discrepante no caso do NaCl: na proporção 1:2 em pH ácido. Ocorreu a diminuição do diâmetro das partículas, discrepância essa que não pode ser desvendada com dados da literatura ou hipóteses dos autores deste trabalho. Portanto torna-se necessário realizar mais experimentos com este sal e aminoácidos, a fim de observar padrões e obter uma descrição do mecanismo pelo qual a interação ocorre.

BIBLIOGRAFIA

BERTINI, I.; SIGEL, A. **Handbook on metalloproteins**. [s.l.] CRC Press, 2001.

CHEN, G. F. et al. **Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development**. *Acta Pharmacologica Sinica* Nature Publishing Group, , 1 set. 2017.

DUDEV, T.; LIM, C. Competition among Metal Ions for Protein Binding Sites: Determinants of Metal Ion Selectivity in Proteins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 538–556, 8 jan. 2014.

EJAZ, H. W.; WANG, W.; LANG, M. **Copper toxicity links to pathogenesis of alzheimer's disease and therapeutics approaches**. *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 2 out. 2020.

GREGORY, K. P. et al. **Understanding specific ion effects and the Hofmeister series**. *Physical Chemistry Chemical Physics* Royal Society of Chemistry, , 9 maio 2022.

HASSELBALCH, K. A. **Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes aus der freien und gebundenen Kohlensäure desselben, und die Sauerstoffbindung des Blutes als Funktion der Wasserstoffzahl**. [s.l.] Julius Springer, 1916.

HOFMEISTER, F. *Arch Exp Pathol Pharmacol*. **Leipzig**, v. 24, p. 247, 1888.

IAVORSCHI, M. ET AL. Cu and Zn Interactions with Peptides Revealed by High-Resolution Mass Spectrometry. *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 9, p. 1096, 31 ago. 2022.

L. NELSON, D.; M. COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l.: s.n.].

MESU, J. G. et al. New insights into the coordination chemistry and molecular structure of copper(II) histidine complexes in aqueous solutions. **Inorganic Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1960–1971, 6 mar. 2006.

RUAN, C.; RODGERS, M. T. Cation- π interactions: Structures and energetics of complexation of Na⁺ and K⁺ with the aromatic amino acids, phenylalanine, tyrosine, and tryptophan. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 44, p. 14600–14610, 10 nov. 2004.

SHTYRLIN, V. G. et al. Complex formation, chemical exchange, species structure, and stereoselective effects in the copper(II)- L/DL-histidine systems. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 4, p. 1216–1228, 28 jan. 2012.