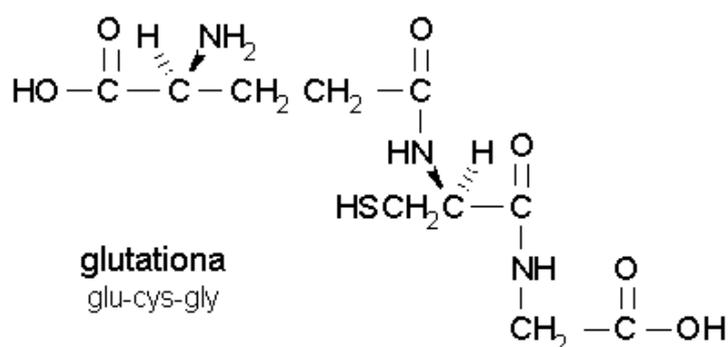
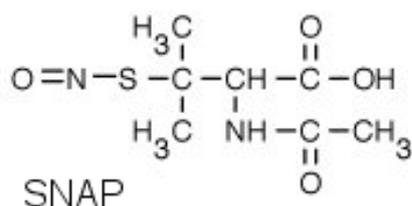


## 5. Procedimentos experimentais

### 5.1 Materiais

As proteínas utilizadas nos experimentos: albumina sérica bovina (BSA), albumina sérica humana (HSA) e insulina bovina, bem como o agente bloqueador de grupos -SH, N-etil-maleimida (NEM), EDTA, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e glutathiona reduzida foram adquiridos da Sigma. Foi utilizada água tipo Milli-Q em todas as preparações.



### 5.2 Técnicas espectroscópicas

As medidas de absorção ótica UV-Visível foram realizadas no espectrofotômetro modelo HP-8452A (Fig. 5.1), Hewlett Packard (Agilent), pertencente ao Laboratório de Espectroscopia de Biomoléculas (Física da PUC-

Rio). Esse espectrofotômetro tem sistema de detecção por arranjo de diodos e resolução de 2 nm. O tempo de integração dos espectros registrados foi de 1 s e foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm e capacidade de 3,0 ml.



Figura 5.1 Fotografia do Espectrofotômetro HP-8452A, Hewlett-Packard.

As medidas de fluorescência foram realizadas no Sistema de Fluorescência modelo QM-1, da PTI - Photon Technology International (Fig. 5.2), também pertencente ao Laboratório de Espectroscopia de Biomoléculas (Física da PUC-Rio). Foram utilizadas cubetas de quartzo, com caminho ótico de 1,0 cm e capacidade de 3,0 ml.

Os dados obtidos com esses equipamentos foram trabalhados e colocados em gráfico usando o programa Microcal Origin.



Figura 5.2 Fotografia do Sistema de Fluorescência QM-1 da PTI - Photon Technology International.

### 5.3 Métodos

#### Reação ácida com nitrito

O método de nitroação utilizado foi o de tratamento com nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em meio ácido, introduzido por Stamler et al..

$\text{NaNO}_2$  em meio ácido ( $\text{HCl}$ ) irá produzir  $\text{HNO}_2$  e, também, quantidades menores de  $\text{N}_2\text{O}_3$  e  $\text{NOCl}$ . Essas espécies são agentes de nitroação mais fortes que o  $\text{HNO}_2$ . Usamos, ao longo da apresentação dos resultados, nitrito/ $\text{HCl}$  para designar todas estas espécies reativas de nitrogênio geradas, que produzem as reações de nitroação, que são o nosso objetivo central.

Para os experimentos de absorção óptica, cujos resultados são apresentados no Capítulo 6, utilizamos a mesma forma de nitroação: as proteínas foram dissolvidas em água para concentrações finais entre 0,12 e 0,50 mM, conforme relacionado para cada experimento. Para obtenção de espectros diferenciais de absorção, a medição do branco era feita com a proteína (albumina ou insulina) em  $\text{HCl}$  – as concentrações serão indicadas em cada experimento. Fazia-se, separadamente, um controle em outra cubeta, com as soluções de proteína/ $\text{HCl}$

idênticas às da cubeta com a qual se media o branco. Em seguida, adicionava-se uma pequena alíquota de uma solução estoque recém preparada de  $\text{NaNO}_2$  (as concentrações estão no Capítulo 6), que nos daria a proporção desejada em relação à concentração de proteína (albuminas ou insulina). Imediatamente após a adição do nitrito, em temperatura ambiente, iniciávamos as medidas dos espectros diferenciais de absorção, programando o espectrofotômetro para obter espectros em intervalos de tempo previamente escolhidos.

Para medidas de fluorescência as amostras eram diluídas cem vezes.

### **Bloqueio de sulfidrilas com NEM**

O bloqueio de sulfidrilas de cisteínas foi feito adicionando-se N-etil-maleimida na solução da proteína (proporção NEM / proteína de 4:1) durante cerca de 2h. Em seguida a amostra era submetida a gel-filtração, para retirar o excesso de reagente. Resumindo o procedimento, a amostra de cerca de 0,5 ml era colocada em uma pequena coluna previamente preparada com Sephadex G25. Esta coluna era inserida num tubo de centrífuga e o conjunto era submetido a centrifugação (4000 rpm). A amostra controle (sem adição de NEM) também passava por esse procedimento.