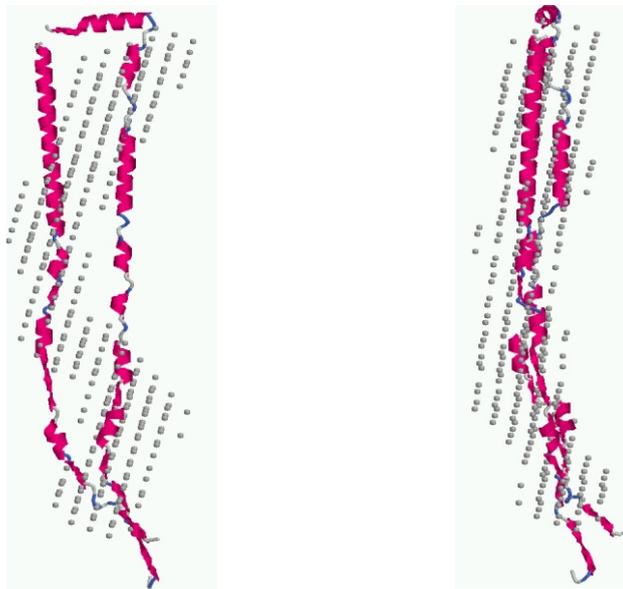


Imagem: Modelo para a proteína Z19 (Forato et. al, 2004b)



Análise da Interação de Proteínas com Lipídios por RMN de ^{13}C em Solução

Lucimara Aparecida Forato¹
Luiz Alberto Colnago²

Embora haja evidências de que muitas proteínas se liguem a ácidos graxos, muitas delas não foram alvo de estudo sobre sua interação com tais lipídios. Uma ferramenta bastante útil para este tipo de estudo é a espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) com a utilização de ácidos graxos enriquecidos em ^{13}C no C-1 para detectar mudanças no ambiente químico da carboxila do lipídio ligado à proteína. Este tipo de análise está baseada no fato de que o deslocamento químico, nos espectros de RMN, é sensível ao ambiente químico. Portanto este parâmetro é indicativo do tipo e número de sítios presentes na proteína. Se houver mais de um sítio de interação, o espectro de RMN de ^{13}C apresentará mais de um sinal para o C-1 do lipídio em questão. Se o sinal do C-1 do ácido graxo estiver em valores de ppm maiores do que o obtido para o ácido graxo puro (na ausência de proteína) é um indicativo de que tal lipídio está ligado à proteína via interação eletrostática, apresentando, portanto um sinal desblindado em maior valor de ppm se comparado ácido graxo não ionizado. No caso de interações hidrofóbicas observa-se uma diminuição nos valores de deslocamento químico do C-1 do ácido graxo em questão. Isto ocorre porque sendo o deslocamento químico () sensível ao ambiente químico, espécies blindadas (por exemplo, ausência de polaridade) deverão ter seus valores de deslocados para a esquerda num espectro de RMN, ou

seja, menores valores em ppm.

O estudo de interações de proteínas com lipídios pela RMN de ^{13}C foi empregado com sucesso no estudo da albumina de soro bovino (BSA) que apresenta vários sítios de interação com ácido oléico (AO) enriquecido em 99% de ^{13}C no C-1 e à proteínas que se ligam a ácidos graxos intra-celulares (iFABP). No caso da BSA os autores observaram vários sinais para a carboxila em diferentes concentrações de proteína/AO, correspondendo a vários tipos de sítios de ligação (WANG et al., 2002).

No entanto Cistola et al. (1988) analisaram as interações da "Fatty acid binding protein" de fígado de ratos (L-FABP) com o AO pela RMN de ^{13}C , e, observaram que o complexo AO/L-FABP exibiu um único pico para o C-1 do AO em tal complexo. Segundo os autores este resultado não implica necessariamente que a L-FABP tenha somente um sítio de ligação para o AO pois a intensidade do pico cresceu com o aumento da razão molar AO/FABP. Desta forma tal sinal de ressonância deve representar mais do que um sítio de ligação para o AO na L-FABP. Os grupos carboxílicos das moléculas de AO ligadas em diferentes sítios experimentam ambiente molecular similar, próximo à superfície da proteína.

Stolowich et al. (1997) analisaram a proteína-2 transportadora de esteroide (SPC-2), também conhecida como proteína não específica de transferência de lipídio.

¹ Química, Dra. Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua: XV de Novembro, 1452, CEP 13560-970, São Carlos, SP. lucimara@cnpdia.embrapa.br

² Farmacêutico, Dr. Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua: XV de Novembro, 1452, CEP 13560-970, São Carlos, SP. Colnago@cnpdia.embrapa.br

Os autores observaram que ao se adicionar ácido esteárico enriquecido em ^{13}C no C-1 (AE) à proteína em pH 7,05 (meio aquoso), para se obter uma razão SPC-2/AE de 2/1, houve o aparecimento de um sinal em 182,7 ppm no espectro de RMN de ^{13}C . A adição subsequente de AE para obter uma razão SPC-2/AE de 1/1, resultou no aumento da intensidade do sinal observado para a razão 2/1. Alíquotas adicionais de AE não levaram à mudanças no sinal do C-1 do AE.

Um outro exemplo de proteínas que têm apresentado ácidos graxos livres quando isoladas são algumas prolaminas de milho e milho (FORATO et al. 2004a). As prolaminas são as proteínas de reserva de cereais e são ricas em prolina e glutamina. Dentre as prolaminas de milho, zeínas, as prolaminas têm sido as mais estudadas. Elas são insolúveis em água e solúveis em soluções aquosas de etanol a 70%. Devido ao seu caráter altamente hidrofóbico elas vêm sendo estudadas principalmente por terem a propriedade de formar filmes e apresentarem uso potencial em biomateriais poliméricos (WANG et al. 2004). Além da habilidade das zeínas em formar filmes a sua resistência a ataques microbianos tem despertado interesse comercial. As zeínas também têm sido usadas na preparação de micro-esferas que permitem que uma droga seja liberada somente ao alcançar o intestino, protegendo a droga da acidez do estômago. Também, recentemente houve um estudo sobre a biocompatibilidade das zeínas para produção de biomateriais (engenharia de tecidos *in vitro*) (DONG et al. 2004).

Os filmes a base de zeínas, no entanto sem adição de plastificantes são frágeis, e portanto muitos estudos têm sido feitos sobre adição destes às zeínas para aumentar a flexibilidade dos filmes. Alguns autores têm estudado a adição de ácidos graxos como oléico, palmítico e esteárico como plastificantes para zeínas para aumentar a flexibilidade dos filmes. Compósitos zeína-ácido graxo também podem ser produzidos com os ácidos oléico e linoléico, que apresentam alta ductilidade e resistência à tração. A afinidade das zeínas por plastificantes como ácidos graxos pode ser explicada pela presença dessas substâncias nas zeínas quando extraídas diretamente dos grãos de milho maduro e nos corpos protéticos, que são as organelas onde as zeínas são depositadas (FORATO et al. 2000a). Recentemente, Forato et al. (2000a) identificaram a presença de ácidos graxos livres na zeínas, proteínas de reserva de milho, e corpos protéticos de milho com as técnicas de RMN no estado sólido e em solução. Posteriormente foi então realizado um estudo das interações das zeínas com o ácido oléico (AO) enriquecido em 99% de ^{13}C no C-1 pela RMN de ^{13}C para avaliar os possíveis sítios de ligação das zeínas aos ácidos graxos. Tais resultados foram feitos com as zeínas constituídas pela mistura das proteínas Z19 e Z22 (FORATO et al. 2000b).

Os estudos realizados nas aplicações de zeínas como filme têm sido feitos com as zeínas como mistura de Z19 e Z22. Elas têm massas moleculares relativas (Mr) de 19 e 22KDa, respectivamente, determinadas pela SDS/PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio do inglês: "sodium dodecyl sulfate/polyacrilamide gel").

Neste comunicado serão apresentados os resultados da análise da interação de duas prolaminas com o AO pela RMN de ^{13}C . Uma delas é a Z19 (Mr = 19KDa) obtida a partir da cultivar de milho BR451 e a penisetina (P22) (Mr = 22KDa) obtida de grãos de

milheto, esta última é similar à Z22 (Sainani, 1991). A importância do estudo da interação dessas proteínas com ácidos graxos vem do fato de que além da afinidade dessas proteínas com lipídios ser importante para se avaliar se tal proteína pode ser inserida numa família de proteínas que se ligam a ácidos graxos, a interação das zeínas com tais lipídios é fundamental para os estudos de biofilmes.

As proteínas Z19 e penisetina (P22) foram extraídas de grãos de milho BR451 e milheto respectivamente. A metodologia é baseada no método de extração alcóolica de zeínas encontrado na literatura (FORATO et al. 2000a; FORATO et al., 2004a). Por este método inicialmente é feita a extração do óleo dos grãos moídos em sistema soxlet por 24 horas em hexano. Após esta extração a massa residual é então levada a agitação em solução aquosa de NaCl 0,5 mol/L por 24 horas para remoção das albuminas e globulinas que são solúveis nesta condição. A mistura é centrifugada e o precipitado então é agitado por 24 horas em solução aquosa de etanol a 70% (v/v). As prolaminas, no caso a zeína Z19 e penisetina ficam dissolvidas na solução alcóolica. A solução é levada ao rotaevaporador para evaporação do álcool, assim ocorre a precipitação das prolaminas as quais são posteriormente liofilizadas.

As proteínas assim obtidas (Z19 e P22) foram caracterizadas pela eletroforese em gel contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS/PAGE).

As medidas de interação das prolaminas em questão com o AO foram realizadas no espectrômetro de RMN utilizado foi um Varian, modelo Inova 400, campo de 9,4 T. Os espectros de ^{13}C , foram obtidos com 20000 transientes com pulso de 11,5 s, desacoplamento Waltz, tempo de repetição de 2s, 8096 pontos, tempo de aquisição de 1,2s e janela espectral de 25 KHz. Os espectros foram filtrados com função de decaimento exponencial (lb = 1.5).

Os espectros em solução foram realizados em solução de 70% etanol e 30% de D_2O . Para se preparar os complexos proteína/AO utilizou-se uma concentração de 1 mmol/L de Z19 e P22 (após extração dos ácidos graxos com clorofórmio) em solução de etanol (70% v/v) e D_2O (30% v/v), 1 mmol/L de ácido oléico enriquecido com 99% de ^{13}C na carboxila (Cambridge Isotopes). Em seguida essas amostras foram analisadas por RMN de ^{13}C .

Inicialmente analisou-se os deslocamentos químicos da carboxila do AO misturado com as proteínas Z19 e P22 nas proporções AO/proteína 1/1 e 16/1. O deslocamento químico destas misturas foi comparado ao do AO na mesma solução sem adicionar proteína.

Para analisar o efeito do pH aparente nas amostras de proteína/AO (1/1; 1/4 e 1/8), analisou-se amostras de AO em solução de 70% de etanol e 27% de solução fosfato de potássio 30 mmol/L e 3% de água deuterada. Variou-se o pH aparente na região de 5,54 a 7,27 em intervalos 0,25 unidade de pH, para o ajuste do pH das soluções de fosfato utilizou-se uma solução de ácido fosfórico 0,1 mol/L. A variação dos deslocamentos químicos da carboxila com o pH aparente foi utilizada para encontrar os pKas aparentes das misturas P22/AO e Z19/AO.

Devido à presença de ácidos graxos nas amostras de Z19 e P22, identificada por RMN em solução e estado sólido (FORATO et al., 2004a), realizou-se um estudo de interação dessas proteínas com ácido oléico enriquecido em ^{13}C na carboxila, para avaliar os possíveis sítios de ligação da Z19 e P22 aos ácidos graxos.

Na figura 1 são apresentadas as expansões dos espectros de ^{13}C , na região da carboxila, para as seguintes amostras: AO 1mmol/L em solução 70% de etanol e 30% de água deuterada e a mesma solução contendo penisetina e AO nas seguintes razões molares: 1/1 e 1/16. Os espectros foram adquiridos a 30°C. Nestas condições foi possível observar que só há um único sinal para o carbono da carboxila. Nestes experimentos, (exceto no caso do ácido graxo puro), usou-se 1 mmol/L de penisetina, após a extração dos ácidos graxos com clorofórmio, e variou-se a concentração do AO. Na figura 1 nota-se que o ácido puro apresenta um deslocamento em 179,8ppm, que decai para 178,8ppm, na razão P22/AO, 1/1 e cai novamente para 178,4ppm para a razão P22/AO 1/16. Essa mudança do deslocamento químico para valores mais baixos com o aumento da concentração de ácidos graxos, indica que a carboxila deve estar numa situação mais blindada, ou seja não há favorecimento da forma ionizada da carboxila, portanto podem estar sendo favorecidas interações hidrofóbicas das cadeias laterais de aminoácidos apolares com a cadeia carbônica do AO. Embora nestes experimentos as larguras de linhas obtidas foram comparáveis aos da BSA, diferiram destes últimos pois resultados com apenas um único sinal para a carboxila, que varia de posição com a concentração de AO, não foi observado com BSA, onde os autores obtiveram vários sinais para as diferentes concentrações AO-Proteína. Um único sinal para ácido oléico foi observado para uma proteína de fígado da família das FABP (CISTOLA et al. 1988).

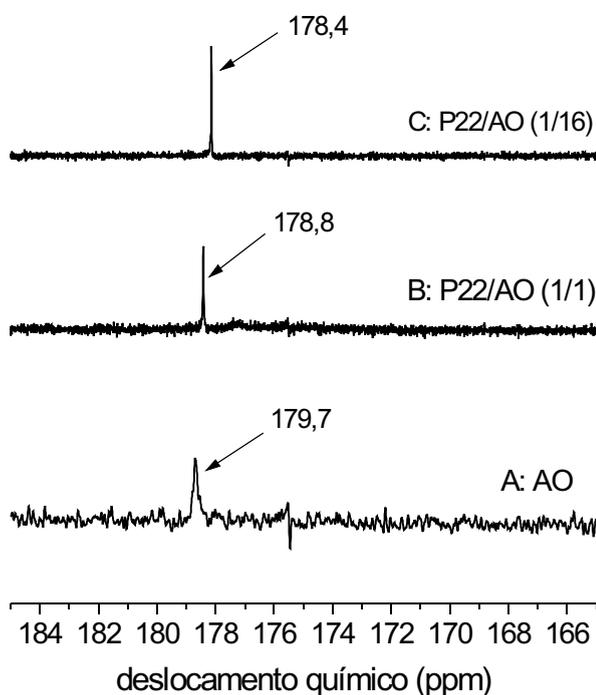


Figura 1: Espectros de RMN de ^{13}C de misturas de penisetina e ácido oléico marcado na carboxila com 99% de ^{13}C , em uma mistura etanol e água na razão 7/3. Espectro B: para a razão P22/AO 1/1 e espectro C: para a razão P22/AO 1/16. Os espectros foram adquiridos a 30°C.

O experimento realizado com a P22 de variar a razão molar proteína/AO e monitoramento do deslocamento químico da carboxila do AO nas diferentes proporções também foi empregado com a Z19. Na figura

são apresentados os espectros do ácido oléico em solução de 70% de etanol e 30% de água deuterada, da Z19/AO nas proporções 1/1 e 1/16. O que chama a atenção nestes espectros é a grande diferença de deslocamento químico entre o ácido oléico, sem adição de Z19 e após a mistura. O AO puro apresenta deslocamento químico da carboxila em 179,7ppm, quando foi adicionada Z19 para dar uma proporção proteína/AO 1/1, observou-se o deslocamento químico da carboxila avançar para 182,9ppm. Isso é um forte indicativo, que ao adicionar essa proteína ao AO, este teve o favorecimento da forma ionizada de sua carboxila, ou seja, deve estar ocorrendo uma interação eletrostática entre a carboxila do AO com sítios carregados positivamente na proteína. Isto porque os valores de deslocamento químico observados para o AO nesta situação indicam que ele está na sua forma dissociada (carregado negativamente) e portanto deve estar associado a um grupo básico carregado positivamente, como resíduos de arginina.

Essa forte interação da Z19 com o ácido graxo também foi observada pela dificuldade em extrair os ácidos graxos desta proteína com clorofórmio. Foram necessárias 5 trocas de solvente, mesmo assim um sinal bem pequeno da região insaturada dos ácidos graxos foi observado no espectro de ^1H . Lücke et al. (2001) expressaram uma proteína da família das "heart-type fatty acid-binding protein" (H-FABP) e analisaram com a RMN bidimensional. Esses autores observaram que não houve a remoção completa dos lipídios de tal proteína, mesmo usando o sistema "LIPIDEX", eles atribuíram essa remoção incompleta dos lipídios à forte ligação do ácido graxo à essa H-FABP, se comparada com outras proteínas de tal família.

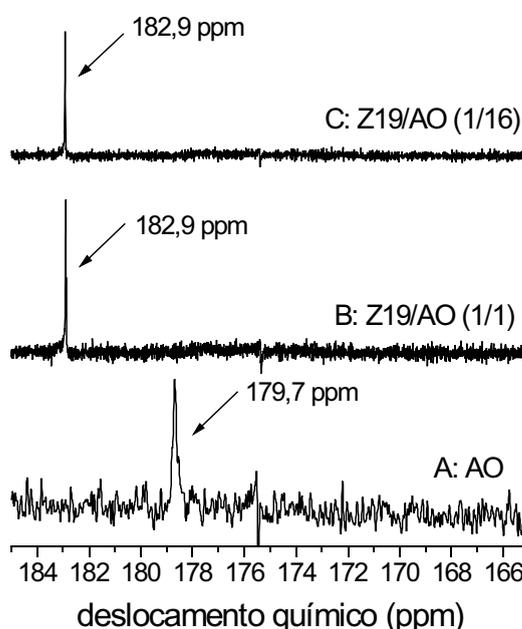


Figura 2: Espectros de RMN de ^{13}C de misturas de Z19 e ácido oléico marcado na carboxila com 99% de ^{13}C , em uma mistura etanol e água deuterada na razão 7/3. Espectro A: ácido oléico puro, espectro B: Z19/AO 1/1 e espectro C: razão Z19/AO 1/16. Os espectros foram adquiridos a 30°C.

Na figura 3 são apresentadas as curvas de titulação para as misturas Z19/AO nas razões molares 1/1, 1/4 e 1/8 e para o AO puro. Na mistura Z19/AO 1/1

não observou-se mudanças significativas na posição do pico do C-1 do AO. Para se manter o pH aparente na faixa de 5,5 a 7,3 (a mesma faixa utilizada para outras proteínas que se ligam a ácidos graxos), as soluções foram preparadas em 70% de etanol, 27% de solução fosfato 30 mmol/L e 3% de D_2O .

Na mistura Z19/AO 1/1, em pH 7 e acima deste valor, o deslocamento químico do C-1 do AO (aproximadamente 182,5 ppm) foi independente da presença de proteína, pois o valor que deve depender da presença da proteína é o pKa, ou seja o pH no qual o ácido graxo se ioniza, após este ponto curvas de titulação tendem a atingir um valor constante, ou seja o estado de ionização do ácido não varia mais.

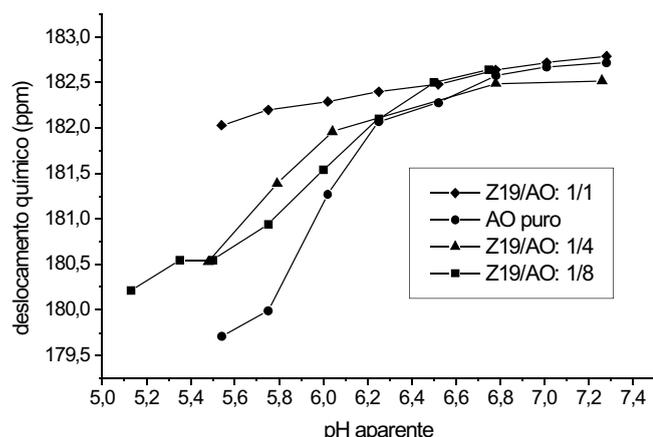


Figura 3: Curvas de titulação dos deslocamentos químicos do C-1 do AO: AO (-●-) e Z19/AO 1/1(-◆-); Z19/AO 1/4 (-▲-) e 5C: Z19/AO 1/8 (-■-).

Na figura 4 são apresentadas as curvas de titulação para as misturas P22/AO nas razões molares 1/1, 1/4 e 1/8 e para o AO puro. A mistura P22/AO (1/1) abaixo de pH 7 apresentou um deslocamento químico para o C-1 do AO inferior ao do AO puro, isto é, a curva de titulação se deslocou para a direita, que é equivalente a um aumento moderado no pKa do AO (figura 4). Em contraste, na presença da Z19, o deslocamento químico foi maior do que o do AO puro (figura 3). Na mistura Z19/AO 1/1 a posição do pico não apresentou diferenças significativas sobre toda a faixa de pH. Nas razões molares proteína/AO 1/4 e 1/8 para as duas prolaminas, as curvas de titulação ocuparam posições intermediárias entre aquelas do AO puro e das misturas proteína/AO 1/1 (figuras 3 e 4). Esta observação pode ser explicada pelo fato de o AO em excesso contribuir para o sinal tanto na condição de ligado à prolamina como devido ao seu excesso.

Como já mencionado este tipo de estudo foi aplicado à proteína BSA. Em tal caso os autores observaram vários sinais para a carboxila em diferentes concentrações de proteína/AO, correspondendo a vários tipos de sítios de ligação. No presente trabalho, entretanto, observou-se um único sinal para o C-1 do AO após interação com as duas prolaminas em várias concentrações e pHs. Este resultado pode ser interpretado como uma troca rápida (na escala de tempo da RMN) entre os sítios de ligação do AO nas proteínas e a solução, de modo que o resultado é um sinal médio entre essas situações. A troca rápida pode ser atribuída à estrutura estendida tanto da Z19 como da P22 em

solução, com os ácidos graxos expostos ao solvente (FORATO et al. 2004b). Dentre as FABPs que se ligam a mais de uma molécula de ácido graxo de cadeia longa, a FABP de fígado apresentou um único sinal para o AO após interação com esta proteína (CISTOLA et al. 1988), e foi sugerido a troca de no mínimo um dos AO ligado com o "bolsão" de oleato (WANG et al. 2002).

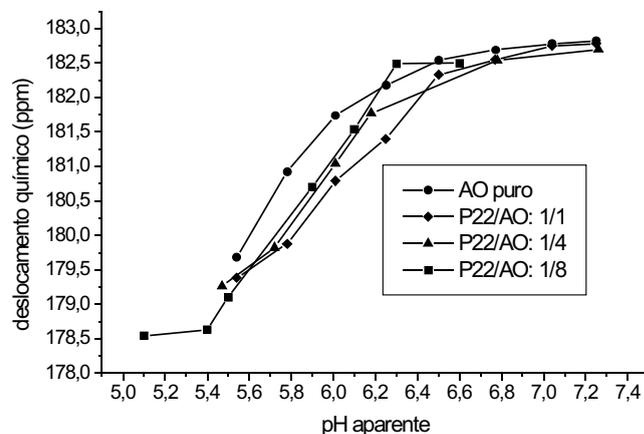


Figura 4: Curvas de titulação dos deslocamentos químicos do C-1 do AO: AO (-●-) e P22/AO 1/1 (-◆-); P22/AO 1/4 (-▲-) e P22/AO 1/8 (-■-).

Num trabalho anteriormente publicado propôs-se que os sítios de ligação nas zeínas deveriam envolver somente resíduos do aminoácido arginina, uma vez que não se observou a presença de lisina nas seqüências dessas proteínas (FORATO et al. 2000b). Este aminoácido básico tem a capacidade de carregar carga positiva na superfície das zeínas, e seu grupo guanidino poderia atrair o grupo carboxílico ionizado de ácidos graxos. Além disso a maioria das seqüências de zeínas contém de um a três resíduos de arginina (FORATO et al. 2000b). Em particular, nas seqüências da Z19 e Z22 (similar à P22) há três resíduos de arginina por molécula, e as posições de duas delas são altamente conservadas na família das zeínas. Por isso partiu-se do princípio de que os sítios de ligação da Z19 e P22 seriam resíduos de arginina. Na figura 5 é apresentada a representação da estrutura do aminoácido arginina onde é destacado o grupo guanidino.

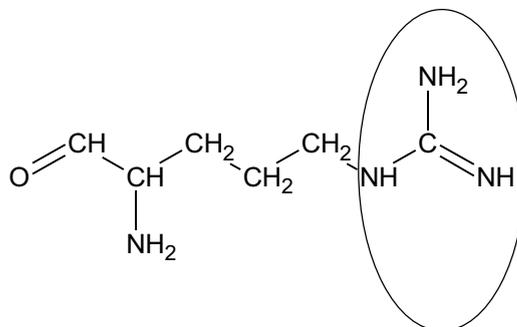


Figura 5: Representação da estrutura do aminoácido arginina. No destaque: o grupo guanidino.

Além disso, no caso da mistura Z19/AO 1/1 (figura 3), o deslocamento químico do C-1 do AO foi 182,9 ppm, em torno de 3 ppm acima do observado para o AO puro. Isto indica que a ligação do AO à Z19 ocorre via interação polar, provavelmente por meio de sítios

ionizáveis. A interação com resíduos de arginina positivamente carregados poderia favorecer a dissociação do AO e o aparecimento do pico do C-1 do AO em maior valor de deslocamento químico do que para o AO puro (CISTOLA et al. 1988). No caso da adição do AO à penisetina o deslocamento químico do C-1 (AO) diminuiu menos de um ppm. Isto indica que não há favorecimento da forma ionizada do grupo carboxila deste ácido e que as interações hidrofóbicas entre a cadeia carbônica do AO e as cadeias de aminoácidos apolares contribuem significativamente para o mecanismo de interação do AO com a P22.

As curvas de titulação do deslocamento químico do C-1 do AO com e sem adição de proteína foram obtidas na faixa de 5,5 a 7,3 (vide figuras 3 e 4). Nesta faixa o deslocamento químico do C-1 do AO variou de 179,4 a 182,8 ppm. A curva de titulação para a mistura P22/AO se deslocou para maiores valores de pH aparente em relação ao AO puro. No caso da Z19, a curva de titulação do C-1 do AO se comportou de forma oposta, variando de 182 a 182,8 para a razão molar 1/1 (figura 3), isto é em torno de 3 ppm acima do observado para o AO sem adição de proteína em pH aparente 5,5. Estes resultados confirmam que a dissociação do hidrogênio do grupo carboxila é facilitada pela presença da Z19. É conhecido da literatura que deslocamentos do equilíbrio de ionização em sistemas onde há interação de espécies iônicas resultam em mudanças no valores de pK aparente das espécies envolvidas (RABENSTEIN et al. 1992; YUSHMANOV et al. 1994). Desta forma, a curva de titulação para a mistura Z19/AO pode ser interpretada como uma forte diminuição do pKa aparente do AO quando em interação com a Z19. Um comportamento similar foi observado para a FABP intestinal de ratos complexada com ácido palmítico, e, para a BSA complexada com ácido mirístico (Cistola et al. 1989).

Então os dados da figura 3 reforçam a hipótese de que a Z19 tem interação eletrostática com o grupo carboxílico do AO, resultando em sua ionização. As cargas positivas na superfície da proteína devem ser oriundas do grupo guanidino dos resíduos de aminoácido arginina estando dois ou três destes em posição conservada na Z19 (Forato et al. 2000b). Não se observou diferenças significativas entre as curvas de titulação para as misturas Z19/AO na razões molares 1/4 e 1/8. Isto indica que a Z19 tem somente um número limitado (um ou dois) de sítios específicos de interação eletrostática com o AO (que são caracterizados pelo deslocamento significativo do pKa aparente do AO para menores valores), ao passo que com excesso de moléculas de AO estas podem se encontrar num ambiente apolar, ou em interação com a proteína ou ainda no ambiente do solvente. No caso da P22, entretanto, observou-se a predominância de interações hidrofóbicas com o AO, resultando em menores valores de deslocamento químico do C-1 do AO na presença desta prolamina.

Conclusões

Com o presente trabalho pôde-se concluir que a RMN de ^{13}C em solução é uma técnica eficaz para analisar interações de lipídios com proteínas. Também concluiu-se que as proteínas Z19 e P22 interagem com o AO de forma oposta. A primeira, via interações eletrostáticas e a segunda por interações hidrofóbicas. A observação de

que os complexos prolamina/ácido graxo apresentaram um único sinal de RMN de ^{13}C para o C-1 do lipídio em questão, indica que o sinal observado é uma média entre as formas livre e ligada dos ácidos graxos. Isto é confirmado pela mudança de deslocamento químico de tal sinal na presença das proteínas. Este comportamento foi observado para a L-FABP complexada com AO (CISTOLA et al. 1988) e para a SPC-2 complexada com o AE (STOLOWICH et al. 1997).

Referências Bibliográficas

- CISTOLA, D. P.; WALSH, M. T.; COREY, R. P.; HAMILTON, J. A., BRECHER, P. Interactions of oleic acid with liver fatty acid binding protein: a carbon-13 NMR study, *Biochemistry*, Washington-DC, v. 27, p. 711-717, 1988.
- CISTOLA, D. P.; SACCHETTINI, J. C.; BANASZAK, L. J., WALSH, M. T., GORDON, J. I. Fatty acid interactions with rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins expressed in *Escherichia coli*. A comparative C NMR study, *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 264, p. 2700-2710, 1989.
- DONG, J.; SUN, Q.; WANG, J-Y. Basic Study of Corn Protein, Zein, as a Biomaterial in Tissue Engineering, Surpharce Morphology and biocompatibility. *Biomaterials*, Surrey, v. 25, p. 4691-4697, 2004.
- FORATO, L.A.; COLNAGO, L. A.; GARRAT; R. C.; LOPES-FLHO, M. A. Identification of free fatty acids in maize protein bodies and purified zeins by ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 1543, p.106-114, 2000a.
- FORATO, L. A.; YUSHMANOV, V. E.; COLNAGO, L. A. Ligação de Ácido Oléico às Zeínas : Estudo por RMN de ^{13}C . In: JORNADA BRASILEIRA DE RESSONANCIA MAGNETICA, 6.; WORKSHOP APLICACOES EM RMN, 2000, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: Associacao de Usuarios de Ressonancia Magnetica Nuclear, 2000b. p. 133-134.
- FORATO, L. A.; YUSHMANOV, V. E.; COLNAGO, L. A. Interaction of two prolamins with oleic acid by ^{13}C NMR. *Biochemistry*, Washington-DC, v. 43, p. 7121-7126, 2004a.
- FORATO, L. A.; DORIGUETTO, A. C.; FISCHER, H.; MASCARENHAS, Y. P.; CRAIEVICH, A. F.; COLNAGO, L. A. Conformation of the Z19 prolamin by FTIR, NMR and SAXS. *J. Agric. Food Chem.*, Easton, v. 52, p. 2382-2385, 2004b.
- LÜCKE, C.; RADEMACHER, M.; ZIMMERMA, A. W.; MOERKERK, H. T. B.; VEERKAMP, J. H.; RÜTERJANS, H. Spin-system heterogeneities indicate a selected-fit mechanism in fatty acid binding to heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP). *Biochemical Journal*, London, v. 354, p. 259-266, 2001.
- RABENSTEIN, D. L.; BRATT, P.; SCHIERLING, T.; ROBERT, J. M.; GUO, W. The interaction of biological molecules with heparin and related glycosaminoglycans. I. Identification of a specific heparin binding site for

histamine, **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 114, p. 3278-3285, 1992.

STOLOWICH, N. J.; FROLOV, A.; ATSHAVES, B.; MURPHY, E. J.; JOLLY, C. A.; BILLHEIMER, J. T.; SCOTT, A. I.; SHROEDER, F. The sterol Carrir Protein-2 Fatty Acid Binding Site: An NMR, Circular Dichroic and Fluorescence Spectroscopic Determination. **Biochemistry**, Washington-DC, v. 36, n. 7, p. 1719-1729, 1997.

WANG, H.; HE, Y.; KROENKE, C. D.; KODUKULA, S.; STORCH, J.; PALMER, A. G.; STARK, R. E. Titration and exchange studies of liver fatty acid-binding protein with ^{13}C -labeled long-chain fatty acids, **Biochemistry**, Washington-DC, v. 41, p. 5453-5461, 2002.

WANG Q.; WANG, JIN-FENG; GEIL, P. H.; PADUA, G. W. Zein Adsorption in Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces Investigated by Surface Plasmon Resonance. **Biomacromolecules**, Washington, v. 5, p. 1356-1361, 2004.

YUSHMANOV, V. E.; PERUSSI, J. R.; IMASATO, H.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. Ionization and binding equilibria of papaverine in ionic micelles studied by ^1H NMR and optical absorption spectroscopy, **Biophys. Chemist.** Amsterdam, v. 52, p. 157-163, 1994.

Comunicado Técnico, 65

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 3374 2477
Fax: 16 3372 5958
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
www.cnpdia.embrapa.br

1a. edição
1a. impressão 2005: tiragem 300

Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz
Secretária Executiva: Valéria de Fátima Cardoso
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Revisão de texto: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Valentim Monzane