Universidade de São Paulo – USP

Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Estabilidade térmica da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp): estudos dos efeitos do pH do meio e do estado de oxidação do ferro por microcalorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia de absorção óptica e dicroísmo circular (CD)

José Wilson Pires Carvalho

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

Agosto de 2010

Dedico este trabalho ao meu Pai José de Ribamar e minha mãe Maria Gorete pelo apoio, carinho e dedicação em prol da minha educação.

Agradecimentos

Agradeço!

Aos meus pais Maria Gorete Pires Carvalho e José de Ribamar Gomes Carvalho pela dedicação, carinho, motivação nas horas mais difíceis sem eles não teria forças para seguir essa jornada;

Aos meus irmãos Genilson, Genilda e Gesilda pelo apoio, carinho e afeto que temos e pelas palavras amigas;

Às minhas tias Eva (segunda mãe), Maria da Guia e Raimunda Teresa pelo apoio e carinho que sempre me motiva.

Aos primos (as) Rita de Kássia, Karla Karolina, Raiza, Rairone, Railson, Amanda e Constância pelo carinho e motivação;

À amiga Beatriz Araújo pelo apoio, incentivo verdadeiro que sempre me foi dado;

Ao Professor Marcel Tabak por sua orientação e pelos laços de amizade, respeito que se formaram nesta convivência e pela oportunidade de poder aprender um pouco do seu conhecimento;

À minha namorada Sumária Silva pelo carinho e apoio nos momentos difíceis nessa jornada;

Aos meus amigos que convivem comigo aqui em São Carlos, pelo apoio moral e pela contribuição direta e indireta na minha formação e neste trabalho. Obrigado em especial a vocês: Adriano, Orlando e Thairo;

Aos meus amigos da Física, Washington, Alexandre e Mike pelas discussões bem humoradas e pela amizade que construímos;

Ao Professor Júlio Borges pela contribuição direta neste trabalho, ensinando-me a operar o software de análises de dados;

Aos professores da graduação na UESPI, Geraldo, Nouga, Rita de Cássia, Cícero, Graça Círiaco por terem participado da minha formação acadêmica;

À minha madrinha, Patrícia, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho, amizade e pela boa convivência;

Ao Ezér Biazin, técnico do laboratório, por toda ajuda na parte instrumental e que sem nenhuma dúvida foi muito importante para o bom desenvolvimento deste trabalho e pela amizade que se construiu nestes dois anos;

A Andressa Patrícia Alves Pinto, técnica, e o doutorando Fernando Melo do laboratório de biofísica do IFSC por toda ajuda na parte instrumental muito importante para o bom desenvolvimento deste trabalho;

Ao grupo de biofísica molecular do IFSC pelo suporte técnico ao longo de todo esse trabalho;

Ao companheiro de laboratório Diógenes Neto pela boa convivência e pela amizade construída;

Às amigas da Bioquímica, Virgínia, Marília, Fabiana, pela amizade de todos os dias;

As amigas Piauienses, Janete, Adriana, Sabrina, Elenice, Eliene, Sâmea, Adriane e a Hendriane que teve que retornar pela amizade e pela tolerância ao logo desses dois anos;

Aos meus amigos Piauienses, José Luis, Jairo, Valdomiro e Flávio pelo apoio e em especial ao Edvan e Jairo, por uma amizade embora recente mais sólida;

Aos amigos do Paraná, Lenilson e Hércules pelo carinho e respeito;

Aos meus amigos da graduação da UESPI pela boa convivência durante quatro longos e bons anos;

Às meninas da pós-graduação, Sílvia e Andréia, por toda a atenção, carinho e pelos bons serviços prestados;

Ao CNPq pela bolsa concedida nestes dois anos de trabalho;

A FAPESP e CAPES pelo suporte técnico;

Resumo

A estabilidade térmica em função do pH para três formas da hemoglobina extracelular gigante do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (HbGp), monitorada atraves de DSC, CD e absorção óptica, e estudada no presente trabalho. Estes estudos possibilitaram a determinação de parâmetros importantes do processo de desnaturação e dissociação da proteína oligomerica em pH ácido, neutro e alcalino. A HbGp se mostrou mais estável no pH ácido do que em pH neutro e alcalino. No meio alcalino a HbGp sofre dissociação oligomérica gerando subunidades tais como o dodecâmero, o trímero e o monômero. Além disso, as técnicas de DSC, dicroísmo circular (CD) e absorção óptica permitiram o monitoramento da desnaturação da estrutura protéica global, da estrutura secundária e do centro ativo da HbGp, em função da temperatura. Por DSC foi determinado que o mecanismo do processo de desnaturação térmica da HbGp é irreversível. As variações de entalpia calorimétrica, ΔH_{cal}, e de van Hoff, ΔH_{vH}, nas formas oxi-, meta- e cianometa-HbGp são bem distintas, em todos os pHs estudados, indicando que o processo de desnaturação é bastante complexo, sugerindo que o pico de transição deve ser composto por varias transições. A ordem de estabilidade apresentada pela HbGp em termos dos valores de temperatura de transição (Tm) foi a seguinte: cianometa- > oxi- > meta- no intervalo de pH 5,0 a 8,0. Os valores de ΔH_{cal} no pH 7,0 para a oxi-HbGp, meta-HbGp e cianometa-HbGp foram de 25 ± 4, 20 ± 2 e 56 ± 4 MJ/mol, respectivamente. Os valores de energia de ativação (E_a) obtidos no pH 7,0 para a oxi- e cianometa-HbGp foram de 673 ± 99 e 780 ± 105 KJ/mol, e no pH 8,0 de 897 ± 106 e 850 ± 201 KJ/mol, respectivamente. Esses valores de energia de ativação são condizentes com os reportados na literatura para outras hemoglobinas. Nos estudos realizados por CD a oxi-HbGp forma hemicromo no pH 6,0 e 7,0, em temperaturas superiores a 40 ^{o}C, e se dissocia em meio alcalino. A oxi-HbGp apresenta temperatura crítica (Tc) nas regiões das hélices-α e do grupo heme praticamente idêntica nos vários pHs estudados. A cianometa-HbGp possui maior quantidade de estrutura secundária do que a oxi-HbGp, e maiores valores de temperatura crítica (Tc),

sendo bem mais estável que a oxi-HbGp, assim como o observado por DSC. Por absorção óptica o comportamento térmico da HbGp é similar ao do CD, sendo observado ainda, além da formação de hemicromo, a presença de espécies pentacoordenadas no pH neutro e alcalino.

Abstract

The thermal stability as a function of the pH, for three forms of the extracellular giant hemoglobin of the annelid Glossoscolex paulistus (HbGp) was monitored by DSC, CD and optical absorption in the present work. These studies allowed the determination of important parameters characterizing the denaturation and dissociation at acid, neutral and alkaline pH values. HbGp was shown to be more stable in acid pH as compared to neutral and alkaline pH values. In alkaline medium, HbGp presents oligomeric dissociation generating smaller subunits such as the dodecamer, the trimer and the monomer. Besides that, the techniques of the DSC, circular dichroism (CD) and optical absorption spectroscopy allowed to monitor, respectively, the denaturation of the global protein structure, of the secondary structure and of the active center of the hemoglobin, as a function of the temperature. By DSC it was determined that the mechanism of the thermal denaturation of the HbGp is irreversible. The variations of calorimetric and van Hoff enthalpies, in the oxy- and cyanomet-HbGp forms, are quite different, for all studied pH values, indicating that the process of denaturation is complex, characterized by a transition peak composed by several contributions. The order of stability presented by the HbGp in terms of the transition temperature values (Tm) was the following: cyanomet-> oxy- for pH from 5.0 to 8.0. The values of ΔH_{cal} at pH 7.0 for the oxy-HbGp, met-HbGp and cianomet-HbGp were 25 ± 4, 20 ± 2 and 56 ± 4 MJ/mol, respectively. The activation energy values (Ea) obtained at pH 7.0 for the oxy- and cyanomet-HbGp were 673 ± 99 and 780 ± 105 KJ/mol, and at pH 8.0 they were 897 ± 106 and 850 ± 201 KJ/mol, respectively. Those energy values are consistent with data reported in the literature for other hemoglobins. In the studies carried out by CD for oxy-HbGp formation of hemichrome was observed at pH 6.0 and 7.0, at temperatures above 40 ^{o}C. In alkaline medium the oligomeric dissociation is observed. Oxy-HbGp presents critical temperatures (Tc), which are practically identical in the spectral regions of the polypeptide and of the heme groups for all studied pH values. The cyanomet-HbGp own larger quantity of secondary structure than oxy-HbGp, and higher values of critical temperatures (Tc), being more stable than oxy-HbGp, in

agreemente with DSC data. Optical absorption spectroscopy shows thermal behavior of HbGp similar to that observed by CD. Besides the formation of the hemichrome species upon heating, the presence of penta-coordinate species at neutral and alkaline pH values was observed.

Lista de Figura

Figura 1: Estrutura de duas hemoproteínas bastante estudadas (A) hemoglobina cuja principal função é o transporte de oxigênio dos pulmões para as células, (B) mioglobina que possui a função de armazenar o oxigênio nas células [3]. 20

Figura 2: Grupo prostético heme que é constituído de uma protoporfirina e um átomo de ferro central [3]. 21

Figura 3: (A) Grupo heme na forma T tensa – desoxihemoglobina à esquerda e na forma R relaxada – oxi-hemoglobina à direita. (B) Grupo heme, mostrando as seis coordenações do Ferro. Em amarelo aparece a molécula de oxigênio coordenada, em vermelho o grupo pofirínico, em cinza na parte inferior a Histidina proximal (F8 – significa que a histidina é o resíduo de número oito da hélice-F) [3]. 23

Figura 4: Estrutura quaternária da hemoglobina íntegra de *Lumbricus terrestris*, que pertence à mesma classe Oligochaeta que a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, contendo 144 cadeias globínicas contendo o grupo heme e 36 cadeias Linkers em um arranjo espacial conhecido como modelo do bracelete [7]. O dodecâmero é composto por 3 tetrâmeros $(abcd)_{3,}$ A estrutura do tetrâmero corresponde 1/12 da molécula íntegra contém 1 dodecâmero e 3 linkers L_3 correspondendo a $(abcd)_3L_3$. (A) Íntegra, (B) dodecâmero,(C) tetrâmeros e (D) dímero [10]. 25

Figura 5: Estrutura cristalográfica das subunidades não globínicas da HbLt. Sendo da esquerda para direita os Linkers 1, 2 e 3 ligados a unidade dodecamêrica $(abcd)_3$, respectivamente. As partes ampliadas mostram os contatos das cadeias Linkers com as globinas da HbLt [10]. 26

Figura 6: Ilustração da estrutura de uma proteína na forma nativa (esquerda) e desnaturada (direita) na presença de moléculas de água [3]. 30

Figura 7: Anelídeo *Glossoscolex paulistus.* 34

Figura 8: Ilustração do sistema de um aparelho calorimétrico. As células S e R são de amostra (S-sample) e do padrão ou referência (R-reference) [43]. 40

Figura 9: Termograma de microcalorimetria diferencial de varredura (DSC) da Nitrito redutase, mostrando os parâmetros obtidos pela integração (área) do termograma [39). 43

Figura 10: Medida de DSC da L-HicDH em tampão fosfato de potássio 5 mmol/L, pH 7,0, concentração de proteína: 1 mg / mL e velocidade de varredura 1 K / min. A curva em preto é a experimental e em azul o ajuste. Figura adaptada da referência [37]. 45

Figura 11: Ajuste das curvas de DSC da Albumina do Soro Bovino (BSA) com um modelo de não dois estados, (a) na ausência do surfactante dextran, (b) BSA na presença em proporção igual em peso de dextran e (c) na presença de excesso de dextran [44]. 47

Figura 12: Ilustração do diagrama dos níveis de energia eletrônicos de uma molécula, sendo E_o o nível de energia do estado fundamental e E_1 e E_2 níveis de dois estados excitados. As linhas e_o, e_1,...e_{n-4} representam os níveis vibracionais de energia da molécula [47]. 52

Figura 13: Espectro de absorção óptica da HbGp na forma oxi a 25 ^oC. A banda A é referente às ligações peptídicas, (B) aos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina, (C) ao grupo heme (banda de Soret), (D) grupo heme bandas Q. As transições eletrônicas são do tipo π→π* contendo misturas de transições d→d* devidos aos orbitais do metal (ferro). 54

Figura 14: Curva da fração de desnaturação por temperatura da Fusarium solani Lectin na presença de 0,1mmol/L guanidina tiocianato (Gdn-HSCN) no pH 8,0 [49]. Essa curva da fração de desnaturação foi construída usando dados de intensidade de fluorescência em 348 nm. 55

Figura 15: Origem do efeito do CD. (a) As componentes circularmente polarizadas à esquerda (L) e à direita (R) de radiação polarizada no plano: (I) as duas componentes têm a mesma amplitude e quando combinadas geram a radiação polarizada no plano. (II) as componentes têm amplitudes diferentes e a resultante círculo tracejado é polarizado elipticamente. (b) A relação entre os espectros de absorção e de CD. A banda 2 tem um espectro de CD, positivo, com εL> εR; a banda 3 tem um espectro de CD negativo com εR>εL; a banda 1 corresponde a um cromóforo aquiral ou não quiral (sinal de CD nulo) [51]. 57

Figura 16: Espectros de CD no UV associados a vários tipos de estrutura: (traço e ponto) hélices-α, (traços) folhas-β e (linha cheia) estruturas aleatórias [46]. 59

Figura 17: Termogramas da oxi-HbGp na concentração de 0,5 mg/mL em tampão fosfato-borato 20 mmol/L em pH 7,0, com dois ciclos de aquecimento consecutivos com razão de aquecimento de 1,0 ºC/min, no intervalo de temperatura 30-90 ^oC . Inicialmente, a amostra foi equilibrada por 15 minutos em 30 ^oC e aquecida até 90 ^oC (termograma a), em seguida resfriada para a temperatura inicial 30 ^oC, re-equilibrada por 15 minutos nessa temperatura, e, aquecida novamente até a temperatura final de 90 ^oC. 61

Figura 18: A ajuste do termograma da oxi-HbGp no pH 7,0 utilizando o software *origin* com uma transição (A) e com duas transições (B). 63

Figura 19: Termogramas de desnaturação da HbGp nas formas oxi-, meta- e cianometa, concentração 0,5 mg/mL em solução tampão fosfato-acetato 20 mmol/L de pH 5,0 com razão de aquecimento 1,0 ^oC/min. (A) Curvas experimentais da oxi-, meta- e cianometa-HbGp no intervalo de temperatura 30-95 ^oC. (B) Ajuste da curva experimental com o modelo de não dois estados com duas transições. O mesmo ajuste mostrado para a oxi-HbGp foi realizado para a meta- e cianometa-HbGp e os dados obtidos com esses ajustes estão reunidos na Tabela 3. Nesses ajustes realizados com a oxi-,meta- e cianometa-HbGp no meio ácido (pH 5,0 e 6,0), foi considerado apenas o pico endotérmico do termograma. 67

Figura 20: Termogramas de desnaturação da HbGp nas formas oxi-, meta- e cianometa-. Concentração 0.5 mg/mL em solução tampão fosfato-borato 20 mM e valore de pH 7,0. 69

Figura 21: Ajustes das curvas experimentais com o modelo de não dois estados, com duas transições para (A) oxi-, (B) meta- e (C) cianometa-HbGp no pH 7,0. Os dados obtidos com os ajustes encontram-se reunidos na Tabela 3. 71

Figura 22: Termogramas de desnaturação da HbGp nas formas oxi, meta e cianometa, concentração 0.5 mg/mL em solução tampão fosfato-acetato-borato 20 mmol/L, pH 8,0 com razão de aquecimento 1 ^{o}C/min. 73

Figura 23: Termogramas da oxi- e cianometa-HbGp na concentração 0,5 mg/mL, em tampão fosfato-borato 20 mmol/L, pH 7,0 e 8,0, com razão de aquecimento de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 ^{o}C/min no intervalo de temperatura 30-90 ^{o}C. No pH 7,0 (A) oxi-HbGp, (B) cianometa-HbGp. No pH 8,0 (C) oxi-HbGp e (D) cianometa-HbGp. 79

Figura 24: Ajustes dos termogramas de oxi e cianometa-HbGp na concentração 0,5 mg/mL no pH 7,0 e 8,0, em tampão fosfato-20 mmol/L de borato, razão de aquecimento 1,0 ^{o}C/min com duas transições e com três transições para oxi-HbGp no pH 7,0 e 8,0 e com duas transições para cianometa-HbGp nos dois valores de pH. Os dados termodinâmicos obtidos com os ajustes estão reunidos na Tabela 4. 80

Figura 25 Gráficos de Arrhenius utilizadas na estimativa da energia de ativação da desnaturação térmica irreversível de oxi-HbGp em pH 7,0 (A) e 8,0 (B) e cianometa-HbGp em pH 7,0 (C) e 8,0 (D), nas concentrações 0,5 mg / mL. A energia de ativação E_a corresponde a inclinação da reta do gráfico de Arrhenius (veja equação 10), e Tabela 4. 81

Figura 26: Espectros de dicroísmo circular (CD) da oxi-HbGp, no pH 6.0 (A), pH 7.0 (C) nas regiões das ligações peptídicas na concentração de 0,2 mg/mL, e pH 6,0 (B), pH 7.0 (D) região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos concentração 3,0 mg/mL. Faixa de temperatura 25 - 75 ^{o}C. 87

Figura 27: : Espectros de dicroísmo circular (CD) da oxi-HbGp, no pH 8.0 (A), pH 9.0 (C) região das ligações peptídicas, concentração 0,2 mg/mL. pH 8,0 (B), pH 9.0 (D) na região do grupo heme e dos aminoácidos, aromáticos concentração 3,0 mg/mL. Faixa de temperatura 25-60 ^{o}C. 90

Figura 28: Espectros de dicroísmo circular (CD) da cianometa-HbGp, no pH 6.0 (A), pH 7.0 (C) região das ligações peptídicas, concentração 0,1 mg/mL. pH 6,0 (B), pH 7.0 (D) na região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos, concentração 3,0 mg/mL. Faixa de temperatura 25 -75 ^{o}C. 92

Figura 29: Espectros de dicroísmo circular (CD) da cianometa-HbGp, no pH 8.0 (A), pH 9.0 (C) na região das ligações peptídicas, concentração 0,1 mg/mL. pH 8,0 (B), pH 9.0 (D) na região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos, concentração 3,0 mg/mL. Faixa de temperatura 25 -65 ^{o}C. 94

Figura 30: Fração de desnaturação da HbGp na faixa de pH 6.0 a 9.0, no intervalo de temperatura 25-75 ^{o}C. Oxi-HbGp (A) região peptídica e (B) região do grupo heme e aminoácidos aromáticos. Cianometa-HbGp região peptídica (C) e (D) região do grupo heme e aminoácidos aromáticos. 96

Figura 31: Espectros de absorção óptica no ultravioleta-visível da oxi-HbGp, concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de temperatura 25 - 70 ^{o}C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH 9,0..... 100

Figura 32: Espectros de absorção óptica das bandas Q no visível da oxi-HbGp, concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de temperatura 25-70 ^{o}C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH 9,0. 101

Figura 33: Deslocamento do λ^{Soret}_{max} e absorbância da banda de Soret da oxi-HbGp concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de 25- 70 ^{o}C, com variação de pH de 5,0 a 9,0. (A) λ^{Soret}_{max} e (B) absorbância em 415 nm..... 103

Figura 34: Espectros de absorção óptica no ultravioleta-visível da cianometa-HbGp na concentração 0,3 mg/mL, na faixa de temperatura 25 -70 ^{o}C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH 9,0. 105

Figura 35: Espectros de absorção óptica das bandas Q da cianometa-HbGp, na concentração 0,3 mg/mL, na faixa de temperatura 25 -70°C. (A) pH5,0, (B) pH7,0, (C)pH 8,0 e (D)pH9,0..... 106

Figura 36: Deslocamento do λ^{Soret}_{max} e absorbância da banda de Soret da cianometa-HbGp concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de 25- 70 ^{o}C, com variação de pH de 5,0 a 9,0. (A) λ^{Soret}_{max} e (B) absorbância em 420 nm..... 108

Figura 37: Espectros de absorção óptica no ultravioleta-visível da meta-HbGp na concentração 0,3 mg/mL, na faixa de temperatura 25-70 ^{o}C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH 9,0. 110

Figura 38: Espectros de absorção óptica das bandas Q da meta-HbGp, na concentração 0,3 mg/mL, na faixa de temperatura 25 -70 ^{o}C. (A) pH5,0, (B) pH7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH9,0. 111

Figura 39: Deslocamento do λ^{Soret}_{max} e absorbância da banda de Soret da meta-HbGp concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de 25- 70 ^{o}C, com variação de pH de 5,0 a 9,0. (A) λ^{Soret}_{max} e (B) absorbância em 405 nm..... 113

Figura 40: Fração de desnaturação da HbGp na faixa de pH 5,0 a 9,0 no intervalo de temperatura 25-70 ^{o}C, usando os valores da absorção na banda de Soret. (A) oxi-HbGp 415 nm, (B) cianometa-HbGp 420 nm e (C) meta-HbGp 405 nm..... 114

Figura 41: Janela de entrada do programa origin 7.0lab mostrando os ícones de comando (File, Edit, Graph, etc) na barra de ferramentas superior, e na barra à esquerda (Read Date, Subtract Reference, etc). 129

Figura 42: Subtraindo a linha de base (o tampão) do termograma da amostra. São mostrados os termograma da proteína e do tampão, e a esquerda a janela de seleção do termograma da amostra e do tampão para que sejam subtraídos. 130

Figura 43: (A) A linha de correção da linha de base posicionada da forma desejada, (B) linha de base corrigida. 132

Figura 44: (A) Escolha do modelo de ajuste, (B) iterações do ajuste, e (C) o ajuste final. 134

Figura 45: Interface do Software Spectra Manager mostrando os ícones File, Vew, Other e Help, entre outras ferramentas. 136

Figura 46: Interface do programa Spectra Manager na filtragem do espectro ruidoso de CD (A) Na parte superior da interface é mostrado o comando de filtro e na parte inferior o espectro ruidoso. (B) Na parte superior é mostrado o comando de filtragem movido para a esquerda e na parte inferior o espectro filtrado sobrepondo o espectro ruidoso. 138

Figura 47: Espectros de CD da HbGp na região das ligações peptídicas (A), e na região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos. 139

Lista de Tabelas

Tabela 1: As medidas de DSC foram realizadas com a concentração de proteína de 1 mg / mL e com uma velocidade de varredura de 1 K / min no tampão 50 mmol/L fosfato 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L imidazol. ΔH é a variação de entalpia; ΔH_{VH} e a de entalpia de van t Hoff) [37]. 46

Tabela 2: Parâmetros termodinâmicos das transições do processo de desenovelamento térmico da BSA na presença e na ausência de dextran. Esses dados são dos ajustes mostrados na Figura 10 retirados da referência [44]. As linhas de cima para baixo coorespondem as Figuras 11A, 11B e 11C, respectivamente. 48

Tabela 3: Temperaturas de transição (Tm) da HbGp nas formas oxi, cianometa, e meta na concentração 0,5 mg/mL com razão de aquecimento de 1.0 ^{o}C/min na faixa de pH 5,0-8,0 77

Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação da oxi-e cianometa-HbGp obtidos a partir do ajuste dos termogramas com duas e três transições independentes em valores de pH 7,0 e 8,0 85

Tabela 5: Temperatura crítica Tc (^{o}C) da HbGp nas formas oxi- e cianometa-, para a região peptídica (hélices-α 222 nm) e região do grupo heme (banda de Soret) no intervalo de pH 6,0 ao 9,0 97

Tabela 6: Temperatura critica (Tc) da oxi-,cianometa- e meta-HbGp no intervalo de pH 5,0 ao 9,0 em função da temperatura. Os valores de Fu foram calculado a partir dos valores de absorbância em 415 nm, 420 nm e 405 nm para oxi,cianometa- e meta-HbGp, respectivamente 115

Lista de Abreviaturas ou Siglas

* ***abc*** trímero da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

* ***c*** subunidade monomérica ***c*** da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

* CD- Dicroísmo circular do inglês (Circular Dichroism).

* Cianometa-HbGp - Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* na forma oxidada, tendo como sexto ligante na coordenação do ferro do heme o CN^- e o ferro no estado de oxidação $F^{3+.}$

* CN^- Ligante cianeto

* ***d*** subunidade monomérica ***d*** da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

* Dh - Raio hidrodinâmico

* DLS - Espalhamento dinâmico de luz, do inglês (Dynamic Light Scattering).

* DSC - Microcalorimetria diferencial de varredura do inglês (Differential Scanning Calorimetry).

* Fu - Fração de desnaturação.

* HbGp- Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus.*

* HbLt - Hemoglobina extracelular de *Lumbricus terrestrus*

* Meta-HbGp - Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* na forma oxidada, meta, tendo como sexto ligante na coordenação do ferro do heme o H_2O e o ferro no estado de oxidação $F^{3+.}$

* Oxi-HbGp - Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* na forma reduzida, oxi, tendo como sexto ligante na coordenação do ferro do heme o O_2.

* Tc - Temperatura crítica

* Tm - Temperatura de transição

* ΔH_{cal} – Entalpia calorimétrica.

* ΔH_{vH}- Entalpia de Van Hoff

* ***a*** subunidade monomérica ***a*** da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

* **b** subunidade monomérica ***b*** da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

* Cp - Capacidade calorífica a pressão constante

* E_a –Energia de ativação

Sumário

1.1 Estrutura e função de hemoproteínas 18

3.0 Objetivos 32

3.1.0 Objetivo geral 32

3.1.1 Objetivos específicos 33

5.0 Resultados e discussões 60

5.1.0 Microcalorimetria diferencial de varredura (DSC) 60

5.1.1 Estudo da reversibilidade do processo de desnaturação térmica da oxi-HbGp por microcalorimetria diferencial de Varredura (DSC) 60

5.1.2 Estudo da estabilidade térmica da HbGp nas formas oxi-, meta- e cianometa- em solução ácida, neutra e básica, utilizando microcalorimetria diferencial de varredura (DSC) 64

5.1.3. Estudo do comportamento cinético do processo de desnaturação térmica da oxi- e cianometa-HbGp em valores de pH 7,0 e 8,0. 78

5.2.0 Estudos da estabilidade térmica da oxi- e cianometa-HbGp utilizando Dicroísmo Circular (CD). 86

5.2.1 oxi-HbGp 86

5.2.2 Cianometa-HbGp 90

5.2.3 Fração de desnaturação (Fu) e temperatura crítica (Tc) obtidos da estrutura secundária da oxi- e cianometa-HbGp monitoradas por dicroísmo circular (CD).. 95

5.3.0 Estudo por espectroscopia de absorção óptica no ultravioleta-visível com a hemoglobina do Glossoscolex paulistus nas formas oxi, cianometa- e meta-HbGp. 98

5.3.1. oxi-HbGp. 98

5.3.3 Meta-HbGp 108

5.3.4 Fração de desnaturação (Fu) e temperatura crítica (Tc) monitorando o centro ativo por absorção óptica da oxi-, meta- e cianometa-HbGp. 113

5.4 0 Estabilidade térmica da oxi-, cianometa- e meta-HbGp monitorado por DSC, CD e absorção Óptica. 116

6.0 Conclusões 119

Referências Bibliográficas 121

1.0 Introdução

1.1 Estrutura e função de hemoproteínas

As proteínas são biopolímeros compostos basicamente por carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, enxofre, e algumas proteínas podem possuir átomos de metal em sua estrutura, e essas moléculas desenvolvem diversas funções no meio biológico, como função enzimática, revestimento, defesa, transporte entre outras [1].

Uma das classes de proteínas muito estudadas são as hemoproteínas, que são proteínas globulares, que possuem em sua estrutura grupo prostético (átomo de Ferro) ligado a quatro átomos de nitrogênio do anel protoporfirinico. Essas proteínas possuem cor avermelhada decorrente do anel porfirinico. As transições eletrônicas do grupo porfirínico podem ser influenciadas, pelo estado de oxidação do ferro e pelo ligante ligado ao metal, refletindo diretamente na intensidade da sua coloração [1-5] Essas proteínas apresentam princípios importantes de conformação, dinâmica e função de proteínas [1,2]. O conhecimento de sua estrutura tridimensional com precisão atômica revela muito a cerca de como as proteínas se enovelam e se ligam a outras moléculas, [1,3].

As globinas constituem um dos sistemas mais importantes dentro da química das proteínas. As propriedades intrínsecas das hemoproteínas, assim como a sua relação estrutura-atividade, envolvem fenômenos tais como cooperatividade e afinidade seletiva por ligantes específicos que estão associados a uma variedade de mecanismos que tornam possível a vida [1,4,6]

A hemoglobina humana é uma das hemoproteínas mais estudadas, e teve sua estrutura resolvida utilizando a técnica de cristalografia de raios-X. Esse trabalho foi realizado por Max Perutz em 1959, que revelou uma proteína esférica, com dimensões em torno de 6,5 x 5,5 x 5 nm^3 e massa molecular em torno de 64 kDa. Revelou também, que esta proteína possui um arranjo tetraédrico formado por quatro estruturas polipeptídicas globinas. Sendo estas subunidades globinas com estruturas e funções similares entre si, e são denominadas cadeias α e cadeias β e se encontram arranjadas de forma alternada na estrutura da proteína, ou seja, cadeias α-β-α–β respectivamente. As quatro estruturas estão unidas por ligações não covalentes; por ligações de hidrogênio, pontes salinas e interações de Van der Waals, entre resíduos que se encontram na interface de cada cadeia [1,3]. Sendo que, cada cadeia globínica contém no seu interior um grupo heme, como mostrado na Figura 1.

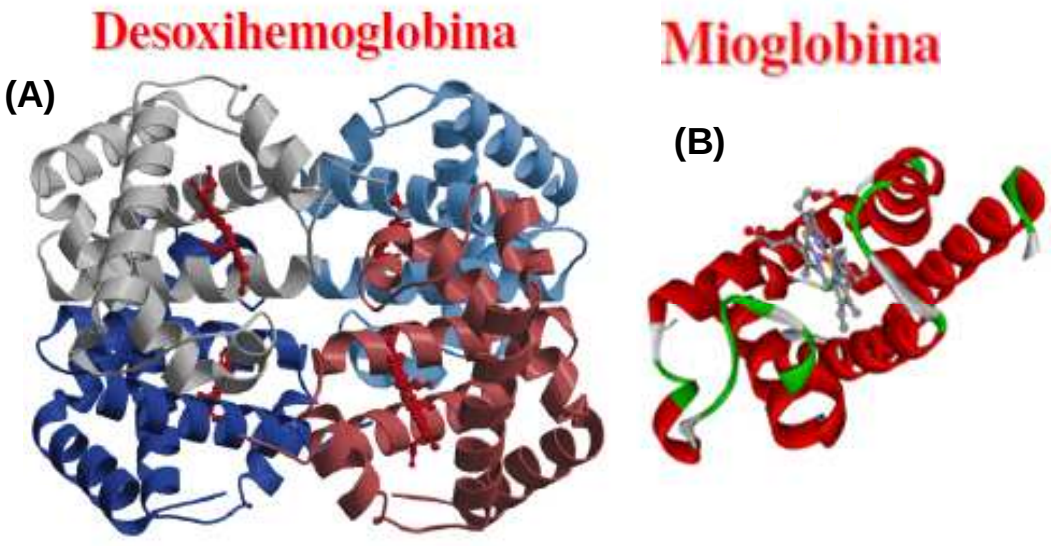


Figura 1: Estrutura de duas hemoproteínas bastante estudadas **(**A) hemoglobina cuja principal função é o transporte de oxigênio dos pulmões para as células, (B) mioglobina que possui a função de armazenar o oxigênio nas células [3].

O grupo heme consiste de quatro anéis pirrólicos coplanares, ligados entre si, e com um átomo de ferro central, que se encontra 0,3 Å fora do plano da porfirina coordenado aos átomos de nitrogênios do anel da porfirina, como mostra a ilustração da Figura 2 [1,5].

O átomo de ferro do grupo heme coordenado a quatro átomos de nitrogênio do anel da porfirina e pode formar mais duas ligações adicionais, sendo uma de cada lado do plano do grupo heme. A quinta coordenação é ocupada pela histidina proximal. Essa interação faz com que o átomo de ferro não fique no plano da porfirina, formando uma estrutura assimétrica [1,5]. A coordenação com o oxigênio ocorre do lado oposto da histidina proximal no grupo heme, e essa ligação Fe-O_2 torna possível o transporte dessa molécula essencial para respiração celular e manutenção da vida. Quando a sexta coordenação do Fe não se encontra ocupada pela molécula de O_2, essa coordenação pode ser ocupada pela histidina distal,

Figura 3A, [1,5]. Nesse caso, quando o nitrogênio do imidazol da histidina distal se encontra coordenada ao ferro tem-se hemicromo ou hemocromo dependendo do estado de oxidação do ferro. Isso significa que, quando o estado de oxidação é Fe^{2+} tem-se o hemocromo e quando o estado de oxidação é Fe^{3+} forma o hemicromo.

O grupo heme encontra-se inteiramente no interior da estrutura com exceção da extremidade que contém dois grupos polares propionatos, que direcionam-se para fora, e encontram-se envolvidos por moléculas de água [1,3]. A vizinhança do grupo heme é composta por aminoácidos apolares com exceção de duas histidinas, a distal e a proximal que se encontram nas hélices H e F, respectivamente, Figura 3 B, [3,5].

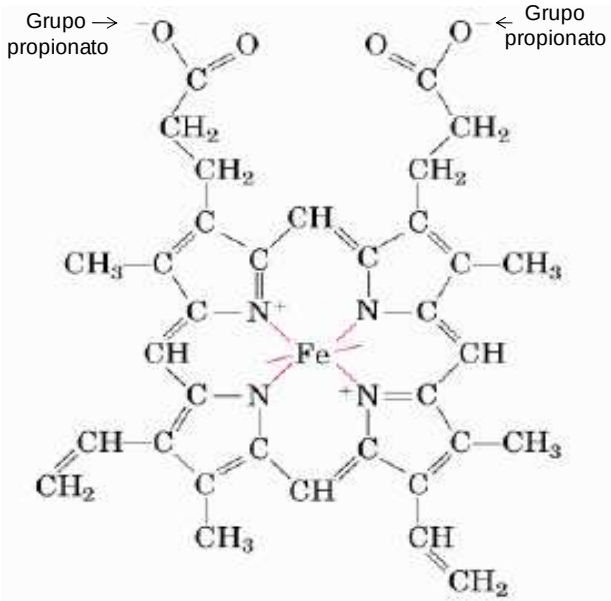


Figura 2: Grupo prostético heme que é constituído de uma protoporfirina e um átomo de ferro central [3].

A ligação de O_2 na hemoglobina ocorre de forma cooperativa, ou seja, a ligação de uma molécula de O_2 ao Ferro de um dos grupos heme facilita a

coordenação do O_2 nos outros hemes do mesmo tetrâmero. Da mesma forma ocorre o processo inverso, ou seja, a perda da molécula de O_2 em um heme facilita a perda nos demais [1,4].

A hemoglobina também transporta o CO_2 formado nos tecidos devido à atividade metabólica, para os capilares alveolares nos pulmões. O CO_2 transportado pela hemoglobina é ligado em resíduos das cadeias α e β principalmente na forma de íon bicarbonato (HCO_3^-) e não é ligado direto ao átomo de Fe do grupo heme [1,3,5].

Outros ligantes podem se coordenar ao Fe do grupo heme além do O_2, e provocar alterações na valência e no estado de spin eletrônico do Fe. Exemplos de ligantes são o ion CN^- (cianeto), íon OH^- (hidroxi) e H_2O (água): a coordenação desses ligantes ocorre com o Fe no estado oxidado (Fe^{+3}). Com o átomo de Fe na forma reduzida (Fe^{+2}) a sexta coordenação pode se encontrar desocupada (desoxi) ou ocupada pelo CO (carboxi), NO (nitrosila) ou pelo O_2 (oxi) entre outros (Figura 3) [3,5].

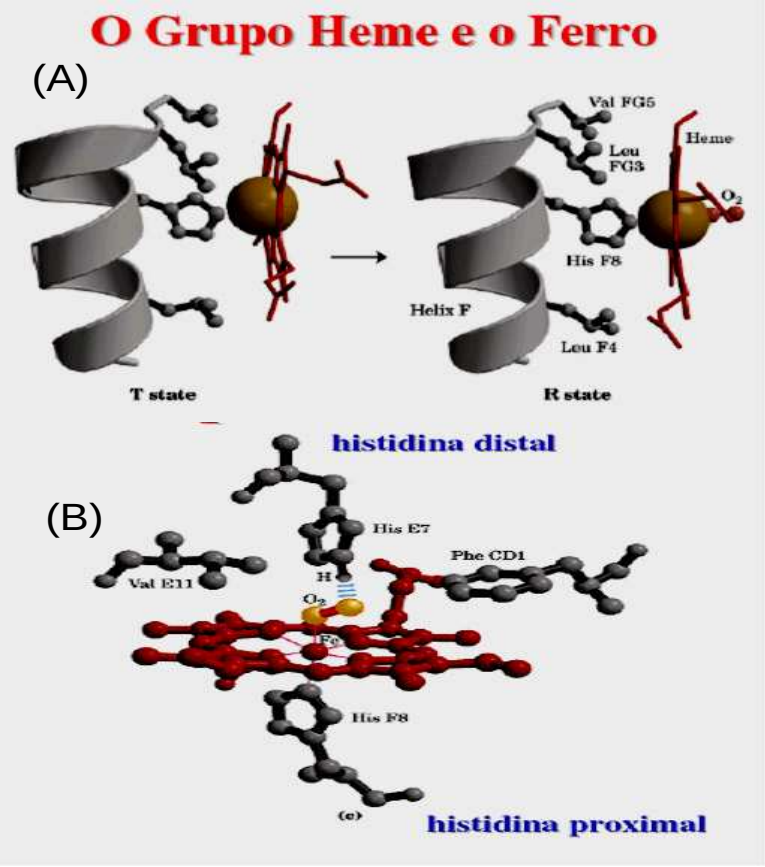


Figura 3: (A) Grupo heme na forma T tensa – desoxihemoglobina à esquerda e na forma R relaxada – oxi-hemoglobina à direita. (B) Grupo heme, mostrando as seis coordenações do Ferro. Em amarelo aparece a molécula de oxigênio coordenada, em vermelho o grupo pofirínico, em cinza na parte inferior a Histidina proximal (F8 – significa que a histidina é o resíduo de número oito da hélice-F) [3].

Quando o átomo de Fe do grupo heme é oxidado a Fe^{+3} a molécula perde sua atividade biológica, ou seja, não consegue ligar reversivelmente oxigênio. Esse estado é muito útil para estudos estruturais da proteína que pode contribuir para a compreensão de suas propriedades funcionais [1,3,5].

As proteínas globulares são ricas em estruturas secundárias tais como hélices-α, folhas-β e “random coil” designadas de estruturas desordenadas ou aleatórias, em menor proporção [2,6]. Dentre as proteínas globulares ricas em

estruturas de hélices-α e folhas-β muito estudadas, a hemoglobina e mioglobina humanas são dois exemplos bem conhecidos.

A mioglobina é uma hemoproteina monomérica, ou seja, possui uma única cadeia globínica, enquanto que a hemoglobina possui quatro subunidades globínicas e grupos heme por molécula. A função da mioglobina no meio celular é armazenar oxigênio nas células, principalmente nos músculos onde ela é encontrada em maior quantidade [1,4]. Já a hemoglobina é responsável pelo transporte de oxigênio no organismo.

Assim como na hemoglobina, na mioglobina o processo de ligação reversível de oxigênio ocorre diretamente ao átomo de Fe do grupo heme. Porém a ligação de oxigênio pela mioglobina não ocorre de maneira cooperativa [3, 5].

1.2 Hemoglobinas gigantes extracelulares

As hemoglobinas dos invertebrados apresentam similaridade com a dos vertebrados, no entanto, as suas subunidades se arranjam de maneira diferente. Principalmente no caso dos anelídeos, que podem apresentar hemoglobinas extracelulares e, em alguns casos, intra e extracelulares [7].

As hemoglobinas extracelulares são também conhecidas como eritrocruorinas e são encontradas em espécies de anelídeos como a *Lumbricus terrestris* e *Glossoscolex paulistus,* sendo ambas pertencentes à classe oligochaeta. Uma das principais características destas hemoglobinas é que elas possuem uma quantidade relativamente grande de subunidades com pesos moleculares entre 16 kDa a 19

kDa, conferindo á proteína uma massa molecular total em torno de 3,6 MDa. Alem disso, essas hemoglobinas apresentam uma alta cooperatividade na ligação de oxigênio, o que as torna um sistema interessante do ponto de vista estrutural e de organização das várias subunidades, sendo um modelo interessante no estudo de relação entre sua estrutura e função [8,9].

Entre as hortológas gigantes extracelulares, a mais estudada é a do *Lumbricus terrestris* (HbLt) que serve como modelo de comparação com outras hemoglobinas homológas, tal como, a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* . A estrutura cristalográfica mais recente da HbLt reportada na literatura com resolução de 3,5 Å mostra com bastante detalhe a disposição em bicamada hexagonal das várias cadeias polipeptídicas que compõem a proteína, incluindo as cadeias globínicas e os linkers (Figura 4) [10].

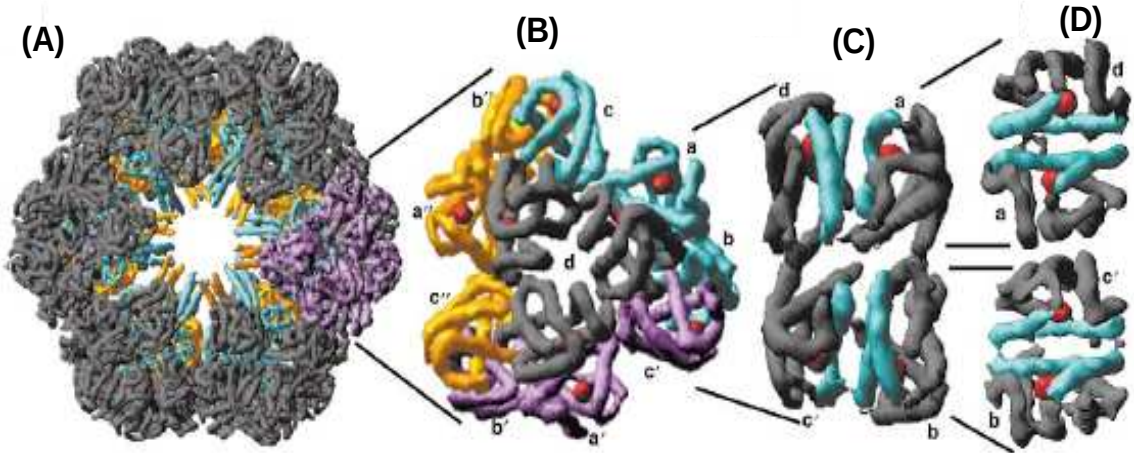


Figura 4: Estrutura quaternária da hemoglobina íntegra de *Lumbricus terrestris*, que pertence à mesma classe Oligochaeta que a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, contendo 144 cadeias globínicas contendo o grupo heme e 36 cadeias Linkers em um arranjo espacial conhecido como modelo do bracelete [7]. O dodecâmero é composto por 3 tetrâmeros (*abcd*)$_{3,}$ A estrutura do tetrâmero corresponde 1/12 da molécula íntegra contém 1 dodecâmero e 3 linkers L_3 correspondendo a $(abcd)_3L_3$. (A) Íntegra, (B) dodecâmero,(C) tetrâmeros e (D) dímero [10].

A hemoglobina do anelídeo *Glossoscolex paulistus* a (HbGp) apresenta uma massa molecular de 3,6 MDa, determinada por Carvalho e colaboradores [8] utilizando a técnica de ultracentrifugação analítica através do coeficiente de sedimentação. Devido á similaridade estrutural entre HbGp e HbLt pode-se propor que essa macroproteína apresenta uma disposição altamente organizada envolvendo 144 cadeias polipeptídicas que contém o grupo heme e 36 cadeias polipeptídicas sem grupos heme, que são denominadas cadeias *Linkers* (Figura 5) [10]. A estrutura oligomérica é composta de dois discos hexagonais, que formam uma espécie de bicamada hexagonal sendo que a dissociação dessa estrutura dá origem a doze unidades de massa molecular equivalente a 1/12 da molécula íntegra correspondendo a cerca de 300 KDa [10,11], e cuja estrutura é $(abcd)_3L_3$, ou seja, contém um dodecâmero, (abcd), e três linkers, L_3.

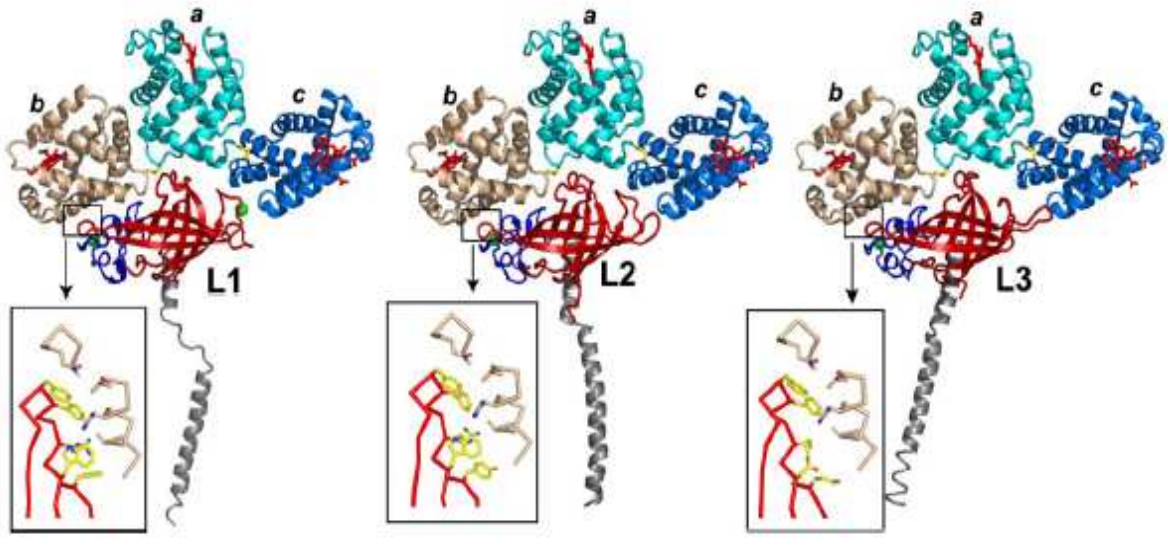


Figura 5: Estrutura cristalográfica das subunidades não globínicas da HbLt. Sendo da esquerda para direita os Linkers 1, 2 e 3 ligados a unidade dodecamêrica $(abcd)_3$, respectivamente. As partes ampliadas mostram os contatos das cadeias Linkers com as globinas da HbLt [11].

A HbGp é composta de quatro subunidades globínicas que contém o grupo heme, denominadas de cadeias *a, b, c e d,* sendo que as subunidades *a, b e c* estão ligadas por pontes dissulfeto formando um trímero (*abc*) e a subunidade *d* mantém-se na forma monomérica [10]. Além destas quatro subunidades que contém o grupo heme, a proteína possui várias cadeias polipeptídicas que não possuem o grupo heme (linkers). A função destas subunidades está provavelmente relacionada com a manutenção da estrutura oligomérica da proteína. No caso da hemoglobina extracelular extraída da minhoca comum no hemisfério norte, a *Lumbricus terrestris*, especialmente na região de Vancouver, Canadá, as subunidades são bem conhecidas em termos de seqüência primária e a estrutura da macroproteína tem sido estudada na forma cristalográfica pelo grupo de W. E. Royer Jr. [10].

A hortologia da HbGp com a HbLt está baseada em estudos de microscopia eletrônica onde é observada a presença de estruturas hexagonais, em pH 7,3, que correspondem à proteína nativa. Entretanto, foi constatado que quando em pH 8,6 essas estruturas não são mais observadas devido a dissociação do oligômero [9,12].

Estudos espectroscópicos com a HbGp revelaram que essa proteína oligomérica se dissocia em pH alcalino [9, 12]. Trabalhos anteriores utilizando como ferramenta principal as espectroscopias de fluorescência e de absorção ótica no UV-VIS indicam que a dissociação alcalina é fortemente dependente do estado de oxidação do átomo de Ferro do grupo heme [15-18]. Estudos com a HbGp na forma oxidada (Fe^{3+}) [13-15] demonstram que a mesma, quando em meio alcalino, sofre completa dissociação em trímeros e monômeros. Dessa forma a hemoglobina na forma oxidada é menos estável em relação ao arranjo oligomérico quando comparada com a espécie não oxidada ou oxi-HbGp. Conseqüentemente a oxidação

da proteína favorece a sua dissociação oligomérica. Um trabalho posterior complementa e evidencia esse efeito da autoxidação na dissociação da proteína [18,19]

Estudos realizados por Zhu e colaboradores. [20] focando a estrutura oligomérica da hemoglobina da *Lumbricus terrestris* constataram que a associação e a dissociação das subunidades são dependentes do estado de oxidação do átomo de Ferro do grupo heme da hemoglobina. A oxidação da estrutura $(abcd)_4$ com ferricianeto causa completa dissociação em monômeros *d* e trímeros *abc*, mas a adição de CN^- mantém o complexo $(abcd)_4$ ou favorece a re-associação das subunidades oxidadas. Esta observação evidencia a ação efetiva do cianeto nas hemoglobinas gigantes, além de enfatizar a correlação entre as modificações do estado de oxidação do grupo heme com as alterações das interações entre as cadeias polipeptídicas, responsáveis pela manutenção da estrutura oligomérica.

Vários estudos vêm sendo realizados por vários grupos de pesquisa sobre a estabilidade e composição da estrutura oligomérica de diferentes proteínas gigantes como a HbGp [13, 18], HbLt [7,20] e hemoglobina de *Arenicola marina* (HbAm) [19]. Estes estudos envolvem o monitoramento dos efeitos das mudanças na composição do meio, variação do pH, presença de sais e de agentes desnaturantes. Os processos de dissociação e re-associação da HbLt têm sido investigados, porém muitas questões relacionadas aos mecanismos de dissociação e re-associação, permanecem não muito bem entendidas. Por esse motivo, há um interesse crescente em entender os processos de dissociação e re-associação desta classe de hemoglobinas. Este tipo de estudos pode fornecer informações úteis sobre as interações entre as subunidades que são necessárias para manter a estrutura global

da proteína. Por outro lado, são poucos os estudos dos efeitos provocados por variação de temperatura na estrutura oligomérica dessas hemoproteínas [21].

2.0 Desnaturação de proteínas

As proteínas na forma nativa são caracterizadas pela presença de uma estrutura tridimensional organizada, em decorrência de um equilíbrio de forças entre as diversas subunidades da proteína e o solvente do meio [21-23]. A desnaturação de proteína envolve a perturbação e rompimento das forças que mantém a conformação nativa, pela quebra de ligações não covalentes, levando à modificação nas estruturas secundária, terciária, e quaternária da proteína [20,23], levando a perda de sua atividade, devido ao desenovelamento dessas estruturas ("unfolding", Figura 6). Entre os efeitos mais comuns que induzem a desnaturação de proteína temos o aumento da temperatura acima de um determinado limite, variação da constante dielétrica do meio em presença de solventes orgânicos, as mudanças drásticas do pH e a presença de agentes químicos específicos em solução que levam à ruptura da conformação nativa (como por exemplo, a uréia e o cloreto de guanidina (GdmHCl) [24-26].

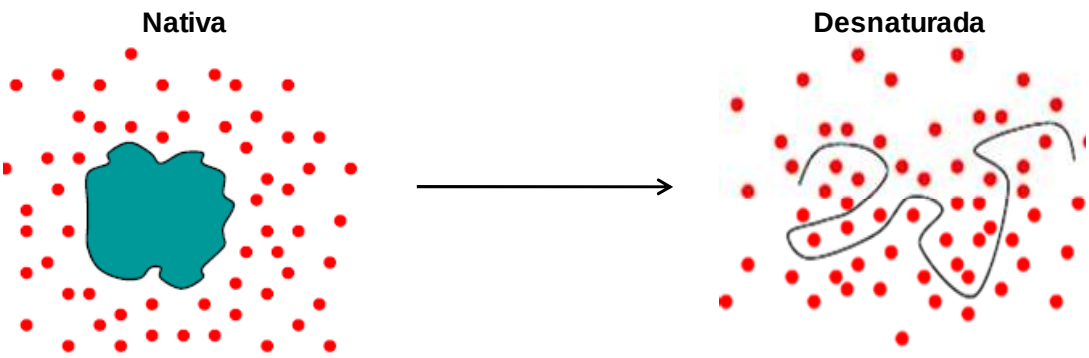


Figura 6: Ilustração da estrutura de uma proteína na forma nativa (esquerda) e desnaturada (direita) na presença de moléculas de água [3].

Alguns estudos têm reportado o efeito da desnaturação na estrutura secundária e terciária de hemoproteínas, assim como mudanças no tamanho e forma das estruturas [27-29], como estudos [29], usando a técnica de DLS com a HbGp, em pH 7,0, revelou que acima de 52 ^{o}C a proteína desnaturou-se aumentando o tamanho da partícula de 27 nm para 65 nm. Por outro lado, a HbGp em pH 7,0 a 25 ^{o}C, é bastante estável, não modificando o seu diâmetro hidrodinâmico, D_h, de 27 nm por um longo período de tempo (72 h). Para valores de pH superiores a 9,0, foi observado o processo de dissociação da proteína, resultando numa partícula de D_h de 10 nm, o que está de acordo com a literatura que associa essa dimensão à unidade dodecâmero $(abcd)_3$ [23]. O dodecâmero originado na dissociação alcalina da HbLt possui um diâmetro de D_h = 10 nm [23].

Estudos de re-associação de proteínas podem trazer também informações relevantes. Estudos realizados com a HbLt [23] mostraram que a proteína após sofrer processos de dissociação oligomérica, pode se re-associar na presença de dications (Ca^{2+} e Mg^{2+}) recuperando cerca de 30 % da estrutura oligomérica. Entretanto, ainda permanece não esclarecido se as espécies re-associadas podem

apresentar a mesma atividade da proteína nativa. Para estudar a re-associação de proteínas, um dos requisitos principais é que as mesmas não tenham sofrido o processo de desnaturação. Por isso, alguns pesquisadores para provocar uma dissociação inicial na proteína sem levar à desnaturação, utilizam a aplicação de pressão hidrostática [28], presença de agentes desnaturantes em baixa concentração (menor do que 2 mol/L, no caso de uréia) [26] ou ainda aceleram os processos de oxidação adicionando agentes oxidantes [18].

3.0 Objetivos

3.1.0 Objetivo geral

Estudar a estabilidade da proteína nativa em relação aos processos de dissociação oligomérica, de oxidação do grupo heme e desnaturação da HbGp em diferentes condições experimentais. Mudanças nos valores de pH e temperatura serão utilizados como agentes externos indutores das alterações da proteína. Estes estudos visam avaliar os mecanismos de dissociação e re-associação, possibilitando uma melhor compreensão das interações das subunidades da proteína.

Considerando que a dissociação alcalina leva à formação de subunidades menores em solução, dependentes do estado de oxidação do ferro, o presente trabalho tem por objetivo avaliar também o efeito desta dissociação na estrutura secundária e terciária das partículas em solução e tentar determinar a energia (ΔH) envolvida nos processos de dissociação e desnaturação. Estes estudos visam aprofundar o conhecimento em nível molecular das interações entre as subunidades responsáveis pela manutenção da estrutura oligomérica da hemoglobina extracelular gigante do *Glossoscolex paulistus,* a HbGp.

3.1.1 Objetivos específicos

1) Estudar por microcalorimetria diferencial de varredura (DSC) os processos de dissociação e desnaturação da macroproteína nas formas oxi-, meta- e cianometa-HbGp no intervalo de pH 5,0 a 8,0 e na faixa de temperatura de 25 a 70 ^{o}C.

2) Obter os parâmetros termodinâmicos tais como a variação da entalpia (ΔH) e a temperatura de transição (T_m) associados à desnaturação da proteína induzida pela temperatura.

3) Avaliar a estabilidade térmica (“melting point”) por dicroísmo circular (CD) da HbGp nas suas formas oxi- e cianometa- em função do pH e temperatura nas mesmas condições do item 1 acima.

4) Avaliar a estabilidade térmica (“melting point”) por absorção óptica da HbGp nas suas formas oxi, meta e cianometa, em função do pH e temperatura nas mesmas condições dos itens 1 e 3 acima.

4.0 Materiais e métodos

4.1.0 Preparação de amostras

4.1.1 Extração e purificação da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp)

A HbGp é obtida pela extração do sangue do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (Figura 7), através de um corte no dorso do animal após o mesmo ser anestesiado em atmosfera de éter etílico. Ao sangue coletado foi adicionada solução anticoagulante de citrato de sódio e ácido cítrico 0,10 mol/L [30].

Figura 7: Anelídeo *Glossoscolex paulistus.*

Após a coleta, o sangue extraído foi centrifugado por 15 min a 2500 rpm para remoção de possíveis impurezas sólidas. Em seguida foi ultracentrifugado por um período de 3 horas a 250.000 x g, a 4 ^{o}C. Após o processo de ultracentrifugação a proteína é obtida na forma de “pellet” (hemoglobina sedimentada no fundo do tubo).

O “pellet” foi ressuspendido em um volume mínimo de tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,0. Como processo final de purificação a hemoglobina foi filtrada em coluna de gel de Sephadex G-200, obtendo-se a proteína pura na forma oxi-HbGp. A concentração da HbGp foi determinada por absorção óptica utilizando coeficiente de absortividade molar $\varepsilon_{415\ nm}$ = 5,5 L $mol^{-1}cm^{-1}$ na banda de Soret [30]

4.1.2 Preparação da HbGp nas formas oxidadas, meta- e cianometa-HbGp

A meta-HbGp foi obtida pela a adição de ferricianeto de potássio a uma alíquota de proteína na forma oxi, na proporção estequiométrica calculada de 1 mol de heme de (HbGp) para 4 mols de ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$), seguido de incubação por 45 minutos, obtendo-se a HbGp na forma meta. Em seguida, foi realizada diálise contra tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,0 para remover o excedente de íons ferro e ferricianeto do meio.

Para obter a cianometa-HbGp foi adicionado a uma alíquota da meta-HbGp cianeto de potássio (KCN) na mesma proporção estequiométrica de ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$), seguido de incubação por um período de 45 minutos, e diálise em tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,0 por 2h, para remoção de excesso de íons ferro- e ferricianeto do meio. A concentração de HbGp foi determinada utilizando o mesmo procedimento efetuado para a forma oxi, através do coeficiente de absortividade molar para a cianometa-HbGp $\varepsilon_{420\ nm}$ = 4,8 L $mol^{-1}cm^{-1}$, e para a meta-HbGp $\varepsilon_{402\ nm}$ = 4,1 L mol^{-1} cm^{-1}, respectivamente na banda de Soret.

4.1.2 Preparação das amostras utilizadas nas medidas das diferentes técnicas experimentais.

4.1.2.1 Medidas de microcalorimetria diferencial de varredura (DSC)

As amostras da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) nas formas oxi-, meta- e cianometa-HbGp usadas nas medidas de DSC foram preparadas seguindo os seguintes procedimentos: soluções protéicas na concentração de 0,5 mg/mL foram obtidas a partir de soluções estoques de concentrações 5,0 e 6,0 mg/mL, respectivamente. Essas amostras foram preparadas no intervalo de pH 5,0 - 8,0 em solução tampão 20 mmol/L de fosfato-acetato para valores de pH ácidos e fosfato-borato em meio básico. As amostras foram submetidas à diálise por 4 horas com a troca do tampão no respectivo pH a cada hora, sendo usado o último tampão da diálise como solução de referência para a linha de base. Todas as amostras foram deareadas por dois minutos sob agitação magnética com velocidade de rotação média.

As medidas de DSC com a oxi-, meta- e cianometa-HbGp em pH 5,0 e 6,0 foram realizadas com razão de aquecimento 1 ^{o}C/min. No pH 7,0 e 8,0 foram usadas razões de aquecimento de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 ^{o}C/min. Todas as medidas de DSC foram realizadas no intervalo de temperatura de 25 a 95 ^{o}C, à pressão constante de 2 atm e 15 minutos de estabilização na temperatura inicial.

Também foram realizadas medidas com dois ciclos de aquecimento para verificação da reversibilidade do processo de desnaturação da HbGp, sendo a

amostra estabilizada em 30 ^{o}C por 15 minutos e aquecida até 90 ^{o}C com razão de aquecimento de 1 ^{o}C/min. Em seguida, a amostra foi resfriada até a temperatura inicial de 30°C, mantida nessa temperatura por mais 15 minutos antes de ser re-aquecida até a temperatura final de 90 ^{o}C.

Na realização das medidas foi usado um aparelho microcalorimétrico modelo VP-DSC da Microcal com potencial de operação na faixa de temperatura de -10 a 110 ºC e pressão de 2 atm com volume de célula de 0, 512 mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em dias diferentes e com amostras preparadas de diferentes estoques.

Os dados obtidos foram analisados usando o software *Origin versão 7.0Lab* fornecido junto com aparelho pela *Microcal. A* subtração do branco (tampão), correção da linha de base e cálculo da área do pico do termograma da HbGp foram realizadas sistematicamente nas análises de dados (veja o apêndice A).

4.1.2.2 Medidas de absorção óptica

As medidas de absorção óptica no UV-VIS com a oxi-, meta- e cianometa-HbGp foram realizadas em duplicata utilizando uma concentração de 0,3 mg/mL em solução de tampão fosfato-acetato 20 mmol/L nos valores de pH ácidos e de fosfato-borato nos valores de pH básicos. As amostras foram preparadas no intervalo de pH de 5,0 a 9,0, sendo que todas as amostras tiveram seus valores de pH checados após a preparação, usando um pH-metro digital PG1800 da Gehaka.

Foi usado um espectrofotômetro U-1000 da Hitachi acoplado a um banho com controlador de temperatura automático. As amostras foram condicionadas numa cubeta de quartzo de caminho óptico 1 cm, com capacidade para 1 mL de solução. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 250-700 nm com a coleta de um ponto a cada 0,5 nm e velocidade de varredura média. Os dados de absorção óptica foram obtidos no intervalo de temperatura de 25 - 70 ^{o}C, sendo obtido um espectro a cada 5 ^{o}C. Os espectros foram obtidos após a estabilização da amostra em cada temperatura por cinco minutos. A temperatura da amostra foi monitorada por um termopar inserido diretamente na amostra.

4.1.2.3 Medidas de Dicroísmo Circular (CD).

As amostras usadas nas medidas de CD foram preparadas seguindo os mesmos procedimentos das medidas de absorção óptica, no intervalo de pH 6,0 - 9,0 e concentração 0,2 e 3,0 mg/mL para as regiões das ligações peptídicas e do heme, respectivamente, para a oxi-HbGp. Para a cianometa-HbGp na região das ligações peptídicas foi usado a concentração 0,1 mg/mL.

As medidas de dicroísmo circular no ultravioleta-visivel foram realizadas na faixa de comprimento de onda entre 195 e 250 nm, que corresponde a região das ligações peptídicas, e de 250 a 500 nm que compreende a região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos. A variação de temperatura foi similar a utilizada nas medidas de absorção óptica.

Um espectropolarímentro da JASCO J720 equipado com controlador de temperatura (Peltier JASCO PFD 425S) acoplado a um banho externo, e uma cubeta de 1 mm de caminho óptico e volume de 300 µL foram utilizados. A coleta dos dados foi realizada pelo acúmulo de oito espectros, sendo o espectro final a média desses espectros, com um aumento de relação sinal/ruído de um fator √8. Os espectros coletados foram filtrados utilizando o software jwexpl32 da JASCO e, após a filtragem, foi efetuada a subtração da linha de base utilizando o software OriginPro 8.0 (Microcal) (veja o apêndice B).

4.3.0 Técnicas utilizadas

4.4.1 Microcalorimetria diferencial de varredura (DSC)

A Microcalorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica usada amplamente no monitoramento das variações de energia envolvidas nos processos de desnaturação de macromoléculas biológicas [31-41].

O aparelho microcalorimétrico é constituído por um sistema adiabático mantido à pressão constante, onde duas células idênticas revestidas por jaquetas adiabáticas são mantidas na mesma temperatura, uma para a amostra e outra para o padrão ou referência. O calor é fornecido ao sistema de forma controlada (Figura 8) [39]. A medida da variação de energia no sistema consiste na comparação dos calores absorvidos ou liberados pelas duas células durante o ciclo de aquecimento.

A diferença de energia absorvida ou liberada é expressa em gráfico de capacidade calorífica (Cp) em função do aumento de temperatura [40-42]. Essa técnica é bastante sensível na detecção de variação de energia no processo de desnaturação de macromoléculas, requerendo uma quantidade mínima de matéria da ordem de 10^{-4} mol/L [34]. A diferença de calor liberado ou absorvido no ciclo de aquecimento corresponde diretamente ao calor absorvido ou liberado pelas moléculas presentes na amostra em estudo [42-44].

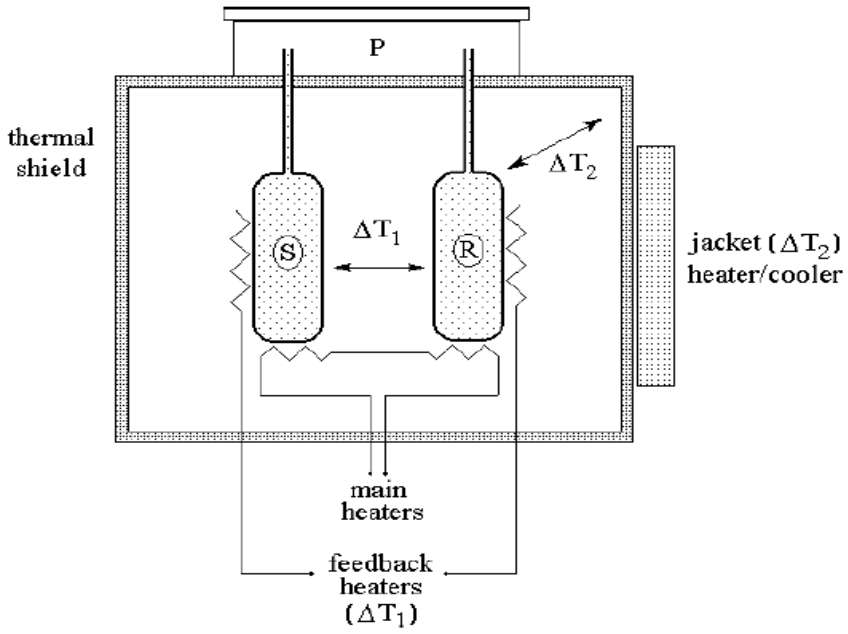


Figura 8: Ilustração do sistema de um aparelho calorimétrico. As células S e R são de amostra (S-sample) e do padrão ou referência (R-reference) [43].

Dos resultados das medidas microcalorimétricas são extraídos vários parâmetros termodinâmicos, tais como a variação da capacidade calorífica ΔCp, a variação de entalpia (ΔH), a variação de entropia (ΔS), a temperatura de transição

(T_m) e a variação de energia livre (ΔG). Todos esses parâmetros termodinâmicos são dependentes da natureza do processo de desnaturação da proteína [39-42]. A variação da entalpia e entropia em função da temperatura no sistema é determinada através da capacidade calorífica a pressão constante Cp que é medida diretamente por DSC e calculada através da equação 1 e 2 [44].

$$\Delta H = \int_{To}^{T} (\Delta Cp) dT$$

(Eq. 1) [42]

$$\Delta S = \int_{To}^{T} \left(\frac{\Delta Cp}{T}\right) dT$$

(Eq. 2) [42]

Sendo a variação da energia livre definida em termos de ΔH e ΔS através da equação 3

$$\left(\Delta G = \Delta H - T\Delta S\right)$$

(Eq. 3) [42]

Em um processo de desnaturação reversível de uma proteína que segue um modelo simples de dois estados (N↔U), ou seja, só existe no sistema proteína no estado nativo (N) ou no estado desnaturado (U) pode-se determinar esses parâmetros termodinâmicos de forma quantitativa. Na transição entre os dois estados existe sempre uma condição equilíbrio entre o estado nativo e desnaturado como descrito pela equação 4 [31,42].

$$\left(N \Leftrightarrow U\right)$$

(Eq. 4)[31]

No sistema reversível quando 50% da proteína se encontrar no estado nativo e 50% na forma desnaturada a variação de energia livre é nula ΔG = 0, e T=ΔH/ΔS, sendo que nas medidas calorimétricas T corresponde a T_m, que é a temperatura de transição ou a temperatura onde o Cp tem o valor máximo no termograma. No equilíbrio entre as formas nativa (N) e desnaturada (U), o ΔG pode ser também expresso em termos da constante de equilíbrio do processo (equação 5) [31,45].

$$\left(K = \frac{[U]}{[N]} \right) \qquad \text{(Eq. 5) [42]}$$

Logo ΔG pode ser expresso através da equação 6 usando a constante de equilíbrio K.

$$\left(\Delta G = -RT \ln K \right) \qquad \text{(Eq. 6) [31]}$$

Onde R é a constante dos gases ideais e T a temperatura em Kelvin.

A energia livre é um parâmetro termodinâmico importante para quantificar e comparar a estabilidade de proteínas. Dessa forma, quando K<1 a forma nativa da proteína é favorecida, do mesmo modo que quando K>1 a forma desnaturada é a favorecida no meio [31,43-45].

Nas medidas calorimétricas ΔH e ΔS são obtidos pela integral da área da curva de capacidade calorífica Cp em função da temperatura no termograma de desnaturação da proteína, através as equações 1 e 2 (Figura 9). A variação de entalpia (ΔH) de desnaturação corresponde à variação total de energia no desenovelamento da proteína, ou seja, corresponde à energia de quebra das

interações internas da estrutura da proteína e a energia de interação do solvente com as estruturas desenoveladas. A maior contribuição energética é atribuída a quebra das interações de hidrogênio, que geralmente se encontram em maior quantidade na estrutura protéica [42]. Quando a proteína é desnaturada a variação de entropia (ΔS) aumenta também, primeiro pela interação do solvente com grupos da estrutura interna quando a proteína é desenovelada e também pelo aumento do número de conformações possíveis da estrutura desenovelada em comparação com a estrutura nativa [42].

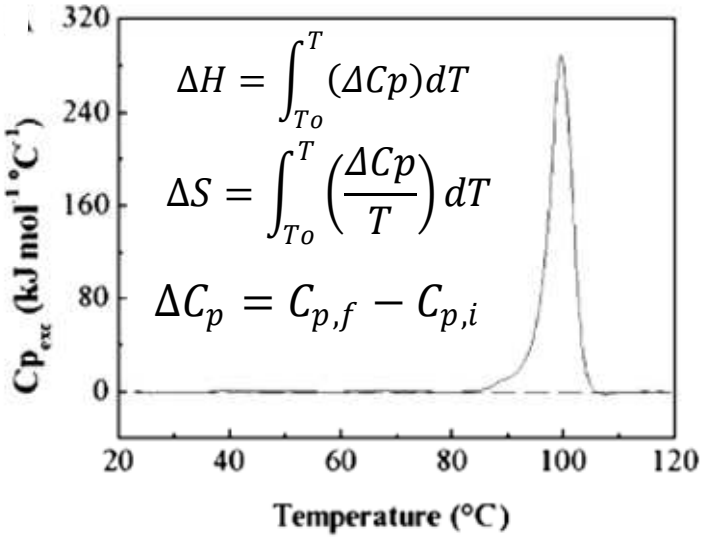


Figura 9: Termograma de microcalorimetria diferencial de varredura (DSC) da Nitrito redutase, mostrando os parâmetros obtidos pela integração (área) do termograma [39).

Outro parâmetro termodinâmico obtido nas medidas microcalorimétricas é a entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}). A variação de entalpia calorimétrica ΔH_{cal} está relacionada com a entalpia de van't Hoff pela equação 7.

$$\Delta H_{vH} = 4RT^2 m \langle \Delta Cp_{tr} \rangle / \Delta H \qquad \text{(Eq. 7) [42]}$$

Onde ΔH_{vH} é a entalpia de van't Hoff, R a constante dos gases ideais, ΔCp_{tr} o valor máximo de Cp no termograma e ΔH a variação de entalpia calorimétrica do processo, ou seja, $\Delta H = \Delta H_{cal}$.

A razão entre ΔH_{cal}/ ΔH_{vH} caracteriza a transição do processo de desnaturação das proteínas nas medidas calorimétricas, ou seja, é o parâmetro que indica o quanto a transição é cooperativa e se a mesma corresponde a uma transição simples de dois estados [42]. Para a obtenção da entalpia de van't Hoff de forma direta de medidas calorimétricas, é necessária a realização de ajustes das curvas experimentais usando um software, como por exemplo, o *Origin* da microcal obtendo-se um ajuste como mostrado na Figura 9. Dependendo da largura do pico de transição no termograma, o mesmo pode ser ajustado com uma única transição através do modelo de dois estados ou com várias transições se houver intermediários no processo de desnaturação da proteína.

Na Figura 9 é mostrado o termograma de desnaturação da L-2-Hidroxisocaproate desidrogenase de *Lactobacillus confusus* [37] onde a curva experimental foi ajustada com uma única transição usando o modelo de dois estados e os dados obtidos com o ajuste são mostrados na Tabela 1.

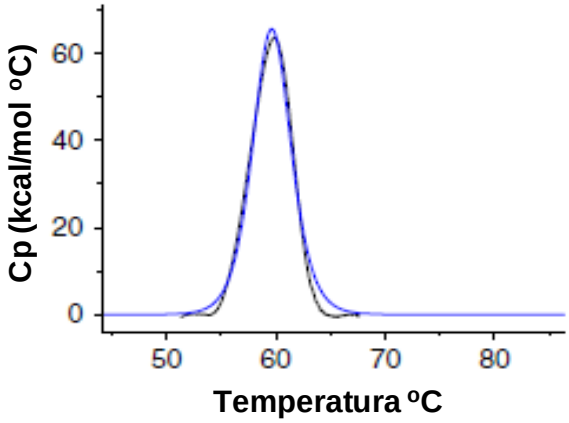


Figura 10: Medida de DSC da L-HicDH em tampão fosfato de potássio 5 mmol/L, pH 7,0, concentração de proteína: 1 mg / mL e velocidade de varredura 1 K / min. A curva em preto é a experimental e em azul o ajuste. Figura adaptada da referência [37].

Na Tabela 1 são mostrados os valores de T_m, ΔH_{cal}, ΔH_{vH}, e da razão ΔH_{cal}/ $\Delta H_{vH.}$ Os valores da razão ΔH_{cal}/ ΔH_{vH} são praticamente iguais a 1, indicando que o processo de desnaturação dessa proteína ocorre por um processo de dois estados [37]. A razão ΔH_{cal}/ ΔH_{vH} próxima de 1 indica também uma alta cooperatividade e baixa complexidade do processo de desnaturação. A cooperatividade é um fenômeno presente em processos reversíveis e irreversíveis muito comuns em proteínas oligoméricas, e quanto maior for a diferença entre os valores de ΔH_{cal} e ΔH_{vH} obtidos no ajuste mais complexa a transição que pode envolver estados intermediários [42].

Tabela 1: As medidas de DSC foram realizadas com a concentração de proteína de 1 mg / mL e com uma velocidade de varredura de 1 K / min no tampão 50 mmol/L fosfato 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L imidazol. ΔH é a variação de entalpia; ΔH_{VH} e a de entalpia de van t Hoff) [37].

pH	Tm (^oC)	ΔH ($KJmol^{-1}$)	ΔH_{vH} ($KJmol^{-1}$)	$\Delta H/ \Delta H_{vH}$ ($KJmol^{-1}$)
6,0	62,55 ± 0,06	929 ± 4	950 ± 4,19	0,978
7,0	55,0 8 ± 0,05	850 ± 17	846 ± 17	1,007
8,0	44,07 ± 0,05	925 ± 16	942 ± 17	0,982

* Dados retirados da referência [37].

Quando o pico de transição do termograma de desnaturação é largo e não se ajusta ao modelo simples de dois estados, o mesmo pode ser ajustado com várias transições, como mostrado na Figura 10. Nessa figura é mostrado o ajuste do termograma de desnaturação da Albumina do Soro Bovino, BSA, na presença e ausência do surfactante dextran [44].

Os valores de T_m, ΔH_{cal} e ΔH_{vH} obtidos com os ajustes estão reunidos na Tabela 2. Comparando os valores mostrados na Tabela 1 com os da Tabela 2 é observado que os valores da razão ΔH/ ΔHvH da BSA são muito maiores do que os obtidos para a L-HicDH com o modelo de dois estados. Esses valores elevados da razão $\Delta H_{cal}/ \Delta H_{vH}$ indicam que o processo de desnaturação da BSA é muito mais complexo do que o da L-HicDH, e, nesse caso, o processo de desnaturação da BSA é menos cooperativo [42]. Quantos mais os valores de $\Delta H/ \Delta H_{vH}$ forem diferentes de 1, mais complexo é a transição e menor a probabilidade dessa transição representar

um único estado de transição, ou seja, essa transição pode ser formada por várias outras transições menores que podem ser determinados através do ajuste dos dados, como mostrado na Figura 11[37,38,42].

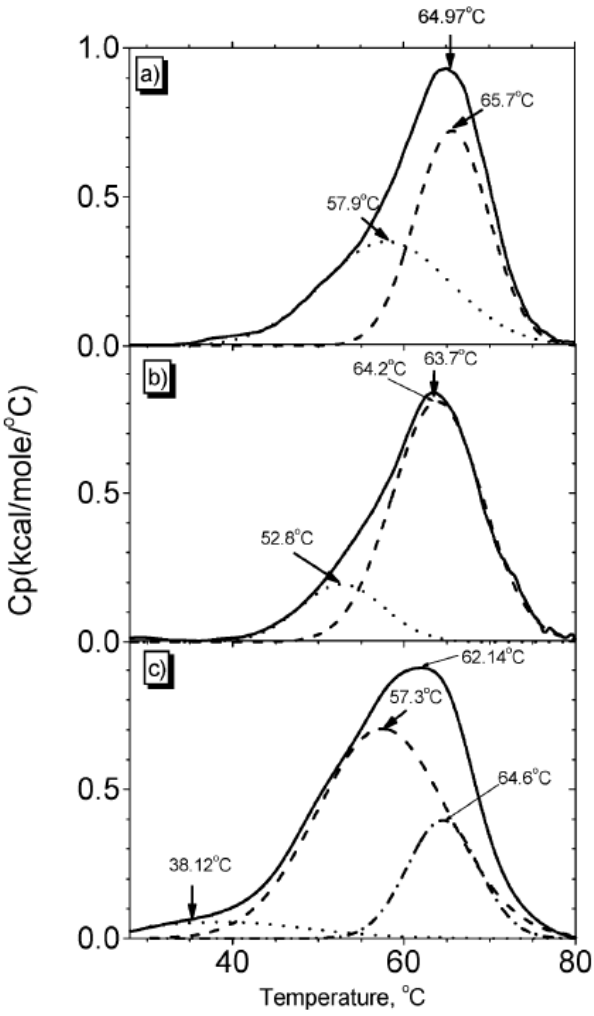


Figura 11: Ajuste das curvas de DSC da Albumina do Soro Bovino (BSA) com um modelo de não dois estados, (a) na ausência do surfactante dextran, (b) BSA na presença em proporção igual em peso de dextran e (c) na presença de excesso de dextran [44].

Tabela 2: Parâmetros termodinâmicos das transições do processo de desenovelamento térmico da BSA na presença e na ausência de dextran. Esses dados são dos ajustes mostrados na Figura 10 retirados da referência [44]. As linhas de cima para baixo cooespondem as Figuras 11A, 11B e 11C, respectivamente.

Tm1 °C	ΔH_{cal1} KJ/mol	ΔH_{vH1} KJ/mol	$\Delta H_{C1a}/\Delta H_{vH1}$ KJ/mol	Tm2 °C	ΔH_{cal2} KJ/mol	ΔH_{vH2} KJ/mol	$\Delta H_{Ca2}/\Delta H_{vH3}$ KJ/mol	Tm3 °C	ΔH_{cal3} KJ/mol	ΔH_{vH3} KJ/mol	$\Delta H_{Ca3}/\Delta H_{vH3}$ KJ/mol
58,0	229	207	1,1	65,7	272	376	0,72	-	-	-	-
53,0	101	307	0,32	63,9	461	305	1,51	-	-	-	-
38,5	48,5	145,8	0,33	57,5	466	202	2,3	64,5	144,1	386	0,37

* Segundo o autor os valores dos erros para os dados mostrados acima são: ± 0,57 Tm, ± 5 % ΔH_{cal} [44].

Os ajustes mostrados na Figura 10 são realizados baseados em um modelo de não dois estados, com pelo menos um intermediário, em que o intermediário representa a proteína parcialmente desnaturada de forma reversível. O modelo mais usado na literatura para esses ajustes é o modelo proposto por Sanchez-Ruiz [31]. Esse modelo é baseado no modelo de Lurmry-Eyring [31], sendo amplamente usado na literatura para o ajuste de termogramas de sistemas irreversíveis. Nesse modelo, é considerado que o processo de desnaturação ocorre com um intermediário entre o estado nativo e o desnaturado, e que a transição entre os dois estados ocorre por etapas como ilustrado na equação 8.

$$\mathbf{N} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathbf{U} \xrightarrow{k_3} \mathbf{F}$$ (Eq. 8) [31]

Onde N é o estado nativo, U o estado em que a proteína se encontra parcialmente desnaturada (intermediário) e F o estado final desnaturado irreversivelmente [31, 45]

$$U \xrightarrow{k_3} F$$ (Eq. 9) [31]

A etapa envolvendo a transição de N para U (equação 8) é considerada reversível, sendo que o estado U representa uma condição de desnaturação parcial da proteína. A etapa descrita pela equação 9 corresponde á transição de U para F, irreversível, sendo o $k_3 >> k_2$. No estado final F a proteína se encontra desnaturada de forma irreversível. Esse modelo é amplamente usado na racionalização de termogramas de proteínas, principalmente no caso de proteínas oligoméricas que possuem estrutura complexa formada por várias subunidades com diferentes estabilidades térmicas [33-38].

Usando esse modelo de Sanchez-Ruiz é possível fazer ajustes de termogramas experimentais com várias transições usando o software *Origin*, sendo que, as transições do ajuste representam as etapas do processo de desnaturação/agregação da proteína, tornando possível a determinação de parâmetros termodinâmicos associados a cada uma dessas etapas, como os ajustes mostrados na Figura 10.

Outro parâmetro termodinâmico muito útil na análise de estabilidade térmica de proteínas é a energia de ativação (E_a), que pode ser obtida diretamente de medidas microcalorimetricas. Entretanto, para o cálculo da energia de ativação é necessário a realização de experimentos com diferentes razões de aquecimento, e o valor de T_m do processo de desnaturação deve ser dependente da razão de aquecimento, ou seja, o processo de desnaturação deve ser cineticamente controlado. Os valores de T_m dos termogramas com várias razões de aquecimento, e no caso de transições largas, são obtidos pelo ajuste mostrado na Figura 10. Esses dados são apresentados em gráfico de Arrhenius com a função velocidade de aquecimento da amostra, dividida pelo quadrado da temperatura de transição (v/Tm^2) para cada transição versus um sobre temperatura de transição ($1/T_m$) através da equação 10 [31, 33]:

$$\ln\left(\frac{v}{T_m^2}\right) = \left(-\frac{E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T_m}\right) \qquad \text{(Eq. 10)}$$

Obtem-se uma reta com inclinação negativa cujo valor é igual a $-E_a/R$, sendo E_a, a energia de ativação e R a constante dos gases ideais [,37,38,45]. Nesse cálculo da energia de ativação o processo de desnaturação é considerado como sendo de primeira ordem, seguindo o modelo de Sanches-Ruiz [31].

4.4.2 Espectroscopia de absorção óptica

A espectroscopia de absorção óptica é uma técnica muito útil para monitorar processos físicos ou físico-químicos que ocorrem quando a freqüência da radiação eletromagnética incidente for maior ou igual à diferença de energia entre dois níveis de energia eletrônica das moléculas em estudo. Parte da radiação incidente é absorvida pelas moléculas da matéria pela promoção de elétrons do estado fundamental para níveis de energia mais elevados (estados excitados). O intervalo de tempo característico do processo de absorção por moléculas em solução é de aproximadamente 10^{-15}s sendo considerado muito curto para que ocorra deslocamento significativo entre núcleos atômicos das moléculas. A energia absorvida (E) está relacionada com a freqüência da radiação pela equação de Planck ($E = h\upsilon$), onde h é a constante de Planck ($6{,}63 \times 10^{-34}$ J s) e υ a freqüência da radiação [5,46,47].

A técnica de absorção óptica baseia-se na comparação da intensidade do feixe de luz inicial (radiação incidente) e final (radiação transmitida) obtidos de uma amostra, em geral diluída, e nessas condições o processo de absorção é governado pela lei de Beer-Lambert, que relaciona a quantidade de luz absorvida com a espessura da amostra e sua concentração. E pode ser expressa pela razão I_0/I que é a fração de luz incidente que é transmitida chamada transmitância (T), e geralmente os dados são apresentados na forma de absorbância através da equação 11

$$T = I/I_0 \rightarrow A = \log T = (I_0/I) = \varepsilon.c.\ell \quad \text{(Eq. 11)}$$

Onde A é a absorbância, ε é o coeficiente de absortividade molar, que é um parâmetro característico de cada espécie em um determinado solvente, C é a concentração da amostra em mol/L e ℓ o caminho óptico que corresponde a espessura da amostra em cm [5,47].

Quando um quantum de energia da radiação é absorvido por uma molécula, elétrons são promovidos do nível de energia fundamental para níveis excitados, ou seja, para níveis de energia mais altos, como ilustrado na Figura 12.

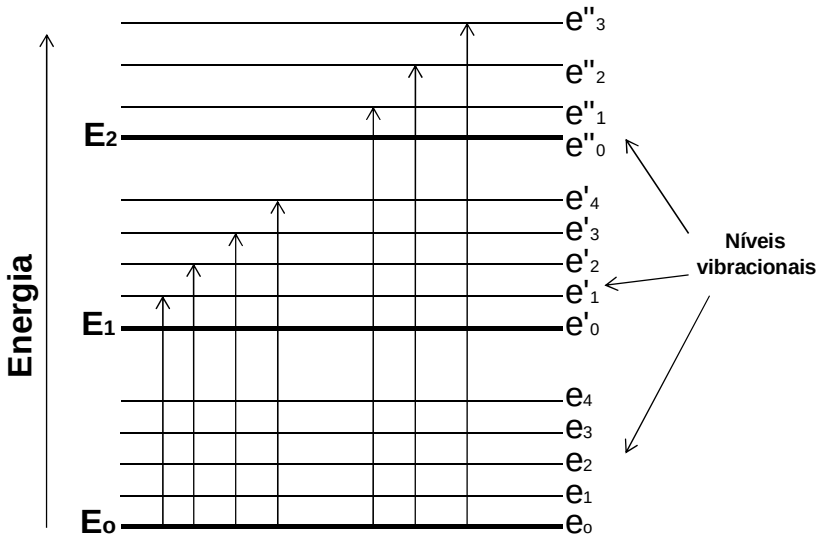


Figura 12: Ilustração do diagrama dos níveis de energia eletrônicos de uma molécula, sendo E_o o nível de energia do estado fundamental e E_1 e E_2 níveis de dois estados excitados. As linhas $e_{o,}$ $e_{1,...}e_{n4}$ representam os níveis vibracionais de energia da molécula [47].

Os parâmetros importantes nessa técnica são os comprimentos de onda dos máximos da absorção, que correspondem à medida da separação entre os estados

de energia, e a largura da banda, que está relacionada com o ambiente em torno do cromóforo, a eventual heterogeneidade de cromóforo e o movimento molecular. Dessa forma, diversas macromoléculas biológicas podem ser investigadas com essa técnica e, no caso das proteínas, devem-se destacar os grupos moleculares que absorvem na região UV-VIS. Esses grupos são, basicamente, os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e as ligações peptídicas, que compreendem a ligação entre dois aminoácidos consecutivos na cadeia polipeptídica de proteína. Os aminoácidos aromáticos absorvem em comprimentos de ondas específicos no UV-VIS, sendo que a fenilalanina absorve em 260 nm, a tirosina em 275 nm e o triptofano em 280 nm e as ligações peptídicas entre 190 – 198 nm [5,18].

Em hemoglobinas, o espectro de absorção na região do visível apresenta bandas em 575 nm e 540 nm denominadas de bandas Q, α e β, respectivamente, e a banda de Soret entre 400 - 415 nm sendo todas essas bandas atribuídas è absorção do grupo heme (Figura 13, [5,18,30]). Dessa forma, pode-se monitorar mudanças nas proximidades do grupo heme e na estrutura da proteína usando espectroscopia de absorção óptica obtendo-se informações relevantes sobre as mudanças conformacionais nas estruturas protéicas e no estado de oxidação do ferro do grupo heme [5,18].

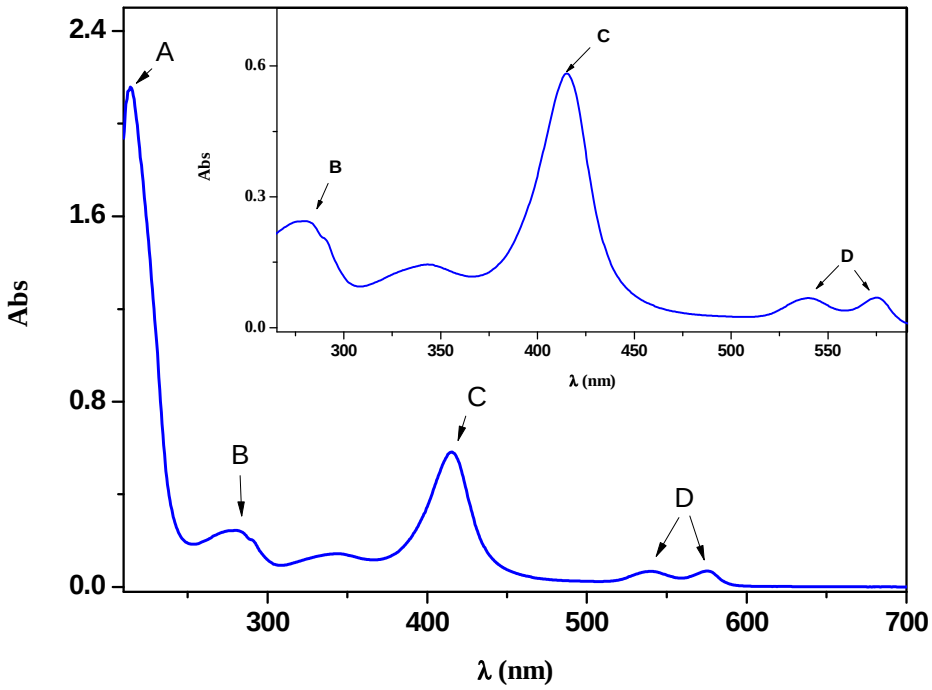


Figura 13: Espectro de absorção óptica da HbGp na forma oxi a 25 ^{o}C. A banda A é referente às ligações peptídicas, (B) aos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina, (C) ao grupo heme (banda de Soret), (D) grupo heme bandas Q. As transições eletrônicas são do tipo π→π* contendo misturas de transições d→d* devidos aos orbitais do metal (ferro) [18].

As transições eletrônicas responsáveis pelas bandas mostradas na Figura 13 podem ser explicadas pelo modelo quântico de combinação linear dos orbitais atômicos dos nitrogênios dos anéis da porfirina e do átomo de ferro, proposto por Huckel. Nesse caso, a banda de Soret que é a mais intensa é atribuída às transições eletrônicas do tipo π→ π* nos orbitais do anel porfirinico, as bandas Q às transições eletrônicas π → π * de menor energia da porfirina misturadas com as transições d→d* do átomo de ferro [5].

Os valores de absorção óptica num comprimento de onda específico como, por exemplo, em 415 nm podem ser parâmetros para monitorar as mudanças na estrutura da proteína, como mostrado na Figura 14. O parâmetro obtido com o

gráfico da figura abaixo é a temperatura crítica, que compreende o ponto onde 50% da estrutura da proteína sofre mudança (se desnatura) e 50% se encontra na forma inicial (nativa) [48].

Os agentes indutores de mudanças na estrutura da proteína podem ser de vários tipos, como por exemplo, o pH a partir de um determinado valor, surfactantes, temperatura entre outros [48].

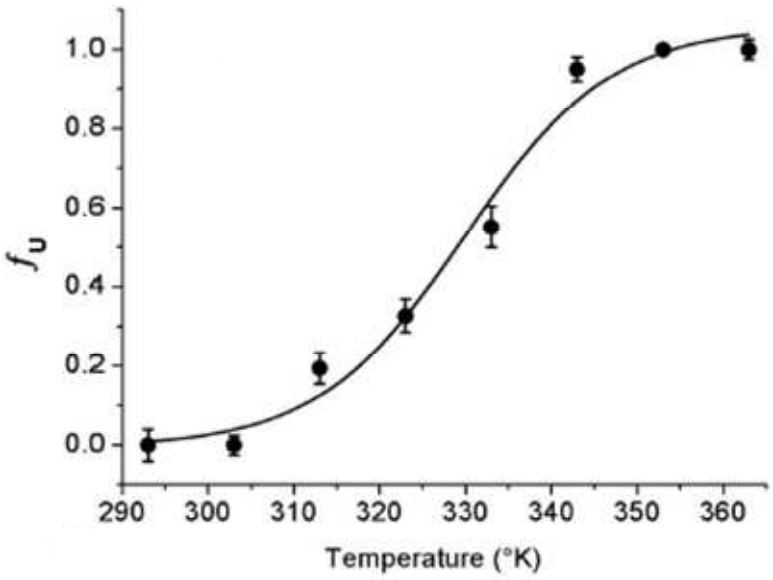


Figura 14: Curva da fração de desnaturação por temperatura da Fusarium solani Lectin na presença de 0,1mmol/L guanidina tiocianato (Gdn-HSCN) no pH 8,0 [49]. Essa curva da fração de desnaturação foi construída usando dados de intensidade de fluorescência em 348 nm.

O gráfico da figura 14 é construído com o auxílio da equação 12 assumindo que a proteína segue um processo de desnaturação simples de dois estados [48].

$$F_u = \frac{\theta_n - \theta_p}{\theta_n - \theta_d} \qquad \text{(Eq. 12)}$$

onde F_u corresponde à fração de proteína desnaturada; Θ_n o valor da absorção da proteína nativa a 25 ^oC; Θ_p a absorção numa temperatura T; e Θ_d o valor da absorção, nesse caso na temperatura mais elevada estudada, que corresponde á proteína na forma desnaturada. A temperatura crítica corresponde à temperatura em que 50% da proteína encontra-se na forma nativa e 50% na forma desnaturada, ou seja, $F_u = 0,5$, que no exemplo mostrado na Figura 14 é 328 K [48,49]. Esse modelo permite calcular o ponto crítico com dados coletados com várias técnicas, como por exemplo, o dicroísmo circular, absorção óptica, fluorescência, entre outras, e é bastante útil para comparar a estabilidade de proteínas [48].

4.4.3 Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)

Grande parte das moléculas biológicas são assimétricas e possuem a capacidade de interagir com a luz polarizada, ou seja, absorvem parte da radiação polarizada quando o vetor campo elétrico da radiação se encontra paralelo ao vetor do momento de dipolo da molécula. Com isso, o dicroísmo circular é uma ferramenta poderosa para estudar mudanças na estrutura de biomoléculas [50,51].

Esta técnica consiste em excitar uma amostra de interesse com um feixe de luz polarizada circularmente à direita e à esquerda. Mede-se a diferença de

absorção da radiação polarizada circular à esquerda L_r e à direita R_r. O sinal é dado em termos da diferença ($\Theta = L_r - R_r$) em função do comprimento de onda. É obtido também a elipticidade [Θ] em unidades de $deg.dmol^{-1}.cm^2$, que é o grau de rotação do campo elétrico da radiação no plano polarizado pelas moléculas. Essa diferença de absorção à direita e à esquerda e a distorção do plano de polarização da luz é sensível a mudanças na estrutura da biomolécula. A determinação desses parâmetros na medida está ilustrada na Figura 15 [51].

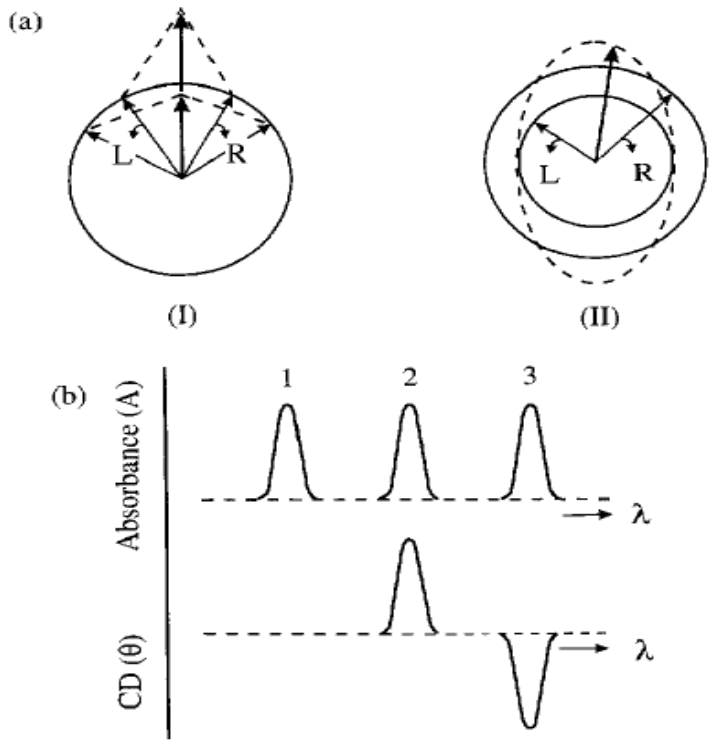


Figura 15: Origem do efeito do CD. (a) As componentes circularmente polarizadas à esquerda (L) e à direita (R) de radiação polarizada no plano: (I) as duas componentes têm a mesma amplitude e quando combinadas geram a radiação polarizada no plano. (II) as componentes têm amplitudes diferentes e a resultante círculo tracejado é polarizado elipticamente. (b) A relação entre os espectros de absorção e de CD. A banda 2 tem um espectro de CD, positivo, com εL> εR; a banda 3 tem um espectro de CD negativo com εR>εL; a banda 1 corresponde a um cromóforo aquiral ou não quiral (sinal de CD nulo) [51].

Essas moléculas que absorvem radiação em um plano polarizado definido são denominadas cromóforos e possuem atividade óptica. No meio biológico é abundante o número de moléculas que possuem atividade óptica, porque, a grande maioria é formada por estruturas complexas, o que facilita a presença de um grande número de centros assimétricos [1,46, 50].

As proteínas possuem basicamente quatro tipos de organização estrutural, a estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. As estruturas primárias são regulares e planares devido às ligações peptídicas rígidas (**O=N**-C-) tendo o restante da cadeia um alto grau de liberdade. Essas características limitam a orientação dos peptídeos vizinhos, no entanto, essa maior liberdade do restante da cadeia possibilita várias interações intramoleculares de hidrogênios (-N---H-) e (-O---H-) e vários arranjos intramoleculares dessas ligações de hidrogênio entre o C-O de uma unidade peptídica e o N-H de outras unidades da cadeia polipeptídica [46, 50,51].

Tendo em vista, que a maioria dos aminoácidos que ocorrem naturalmente nos sistemas biológicos são quirais, a estrutura secundária formada por essas moléculas tendem a apresentar, conseqüentemente, características quirais. O cromóforo peptídico (que absorve na região do UV distante (180 a 240 nm) possui elétrons não-ligantes nos átomos de O e N e os elétrons π encontram se nos orbitais dos átomos de C, N e O [50,51].

Uma das transições eletrônicas no cromóforo peptídico é a $n \rightarrow \pi^*$ esse tipo de transição existe em grande número. Entretanto, ela á proibidas por simetria de orbital. O outro tipo de transição é a $\pi \rightarrow \pi^*$ que é a mais observada. As transições $n \rightarrow \pi^*$ ocorrem na faixa de comprimento de onda 210 - 230 nm, e as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ ocorrem entre 190-195 nm, [49-52].

As proteínas podem apresentar três tipos de formas estruturais peptídicas que podem ser as hélices-α, as folhas-β e as estruturas aleatórias. O espectro de CD característico de hélices-α é caracterizado por ombros de elipticidade negativa de magnitudes similares em 222 (transições *n* → π*) e 208 nm (parte das transições π → π*) e folhas-β com um ombro negativo em 215 nm e um positivo em 198 nm, respectivamente Figura 16, [51,52].

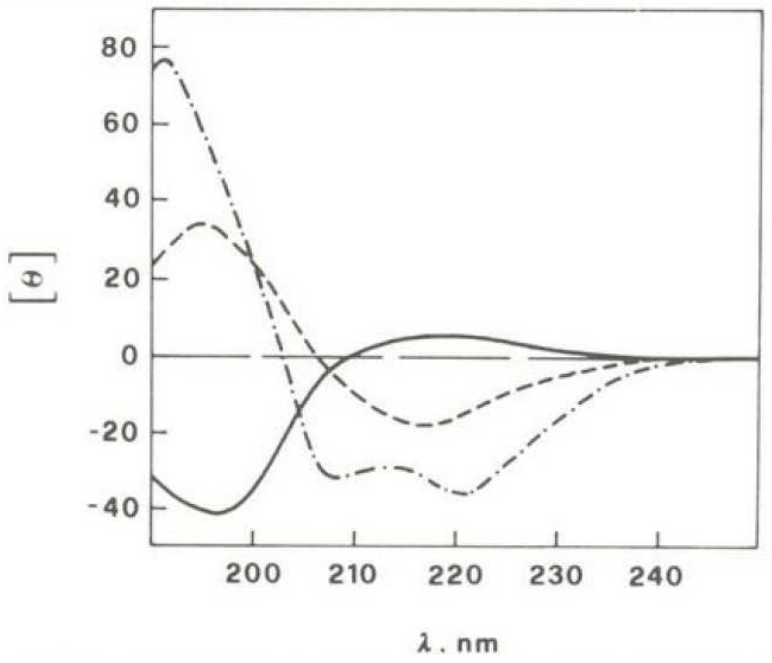


Figura 16: Espectros de CD no UV associados a vários tipos de estrutura: (traço e ponto) hélices-α, (traços) folhas-β e (linha cheia) estruturas aleatórias [46].

5.0 Resultados e discussões

5.1.0 Microcalorimetria diferencial de varredura (DSC)

5.1.1 Estudo da reversibilidade do processo de desnaturação térmica da oxi-HbGp por microcalorimetria diferencial de Varredura (DSC)

A Figura 17 mostra os termogramas de desnaturação da oxi-HbGp no pH 7,0 apresentando Cp, calor especifico, em função do aumento de temperatura, com razão de aquecimento 1 ^{o}C/min e dois ciclos de aquecimento consecutivos. A proteína apresenta processo de desnaturação térmica irreversível, ou seja, uma vez desnaturada a proteína não recupera sua estrutura oligomérica [31].

No primeiro ciclo de aquecimento foi obtido um termograma com um único pico de transição (termograma *a*) com T_m em torno de 60 ^{o}C e o termograma referente ao segundo ciclo de aquecimento não apresenta qualquer pico de transição (termograma *b*) restando basicamente a linha de base (termograma *c*). Esses resultados caracterizam a natureza irreversível do processo de desnaturação da HbGp, como já havia sido observado por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em trabalhos anteriores [29]. A transição bem definida sugere que o processo de desnaturação apresenta fenômeno de cooperatividade entre os vários domínios da HbGp [24,32,34].

A desnaturação irreversível de proteínas com estrutura oligomérica complexa, como é o caso da HbGp, tem sido atribuída a quebra de interações internas covalentes e não covalentes no oligômero, e essas interações não são recuperadas quando a amostra é resfriada de volta á temperatura inicial, [34,42]

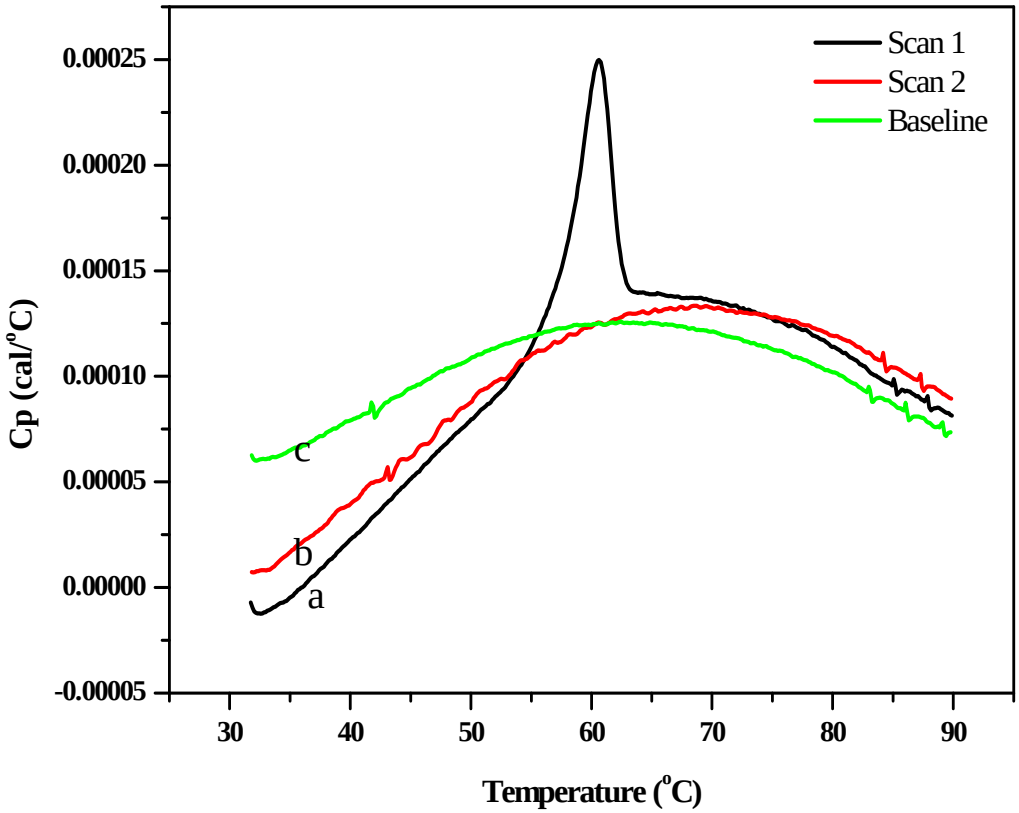


Figura 17: Termogramas da oxi-HbGp na concentração de 0,5 mg/mL em tampão fosfato-borato 20 mmol/L em pH 7,0, com dois ciclos de aquecimento consecutivos com razão de aquecimento de 1,0 ºC/min, no intervalo de temperatura 30-90 °C . Inicialmente, a amostra foi equilibrada por 15 minutos em 30 °C e aquecida até 90 °C (termograma a), em seguida resfriada para a temperatura inicial 30 °C, re-equilibrada por 15 minutos nessa temperatura, e, aquecida novamente até a temperatura final de 90 °C.

Apesar do termograma da oxi-HbGp apresentar uma única transição bem definida, essa transição não se ajusta bem com o modelo de dois estados, se ajustando melhor ao modelo de não dois estados com um intermediário (Equação 8), e duas transições, como será mostrado adiante [31]. Dessa forma, o processo de desnaturação/agregação da HbGp foi analisado através de ajustes com varias transições [24,31,53].

E devido o processo de desnaturação da hemoglobina gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) ser de forma irreversível, os parâmetros termodinâmicos experimentais obtidos com os ajustes usando o modelo de não dois estados que serão mostrados adiante são apenas comparativos e, como descrito pela literatura, não podem ser considerados valores quantitativos precisos associados a processos específicos [31-37].

Entretanto, pare se chegar ao ajuste usado foram feitas várias tentativas usando o software *origin7.0Lab*. Foram testados o ajuste com uma transição para a oxi- e cianometa-HbGp com o modelo de dois estados, no entanto, não se obtém um bom ajuste, como mostrado na Figura 18**,** e com três transições não foi possível obter ajustes, devido o software não encontrar um ajuste que se enquadre na curva experimental. Por outro lado, para a oxi-HbGp no pH 8,0 o melhor ajuste obtido foi com três transições. As tentativas de ajuste foram realizadas deixando os parâmetros de ajustes livres, (temperatura e entalpia). Mas foram testados também ajustes fixando um dos parâmetros e deixando o outro livre, sendo que os melhores ajustes obtidos correspondem aos dois parâmetros livres.

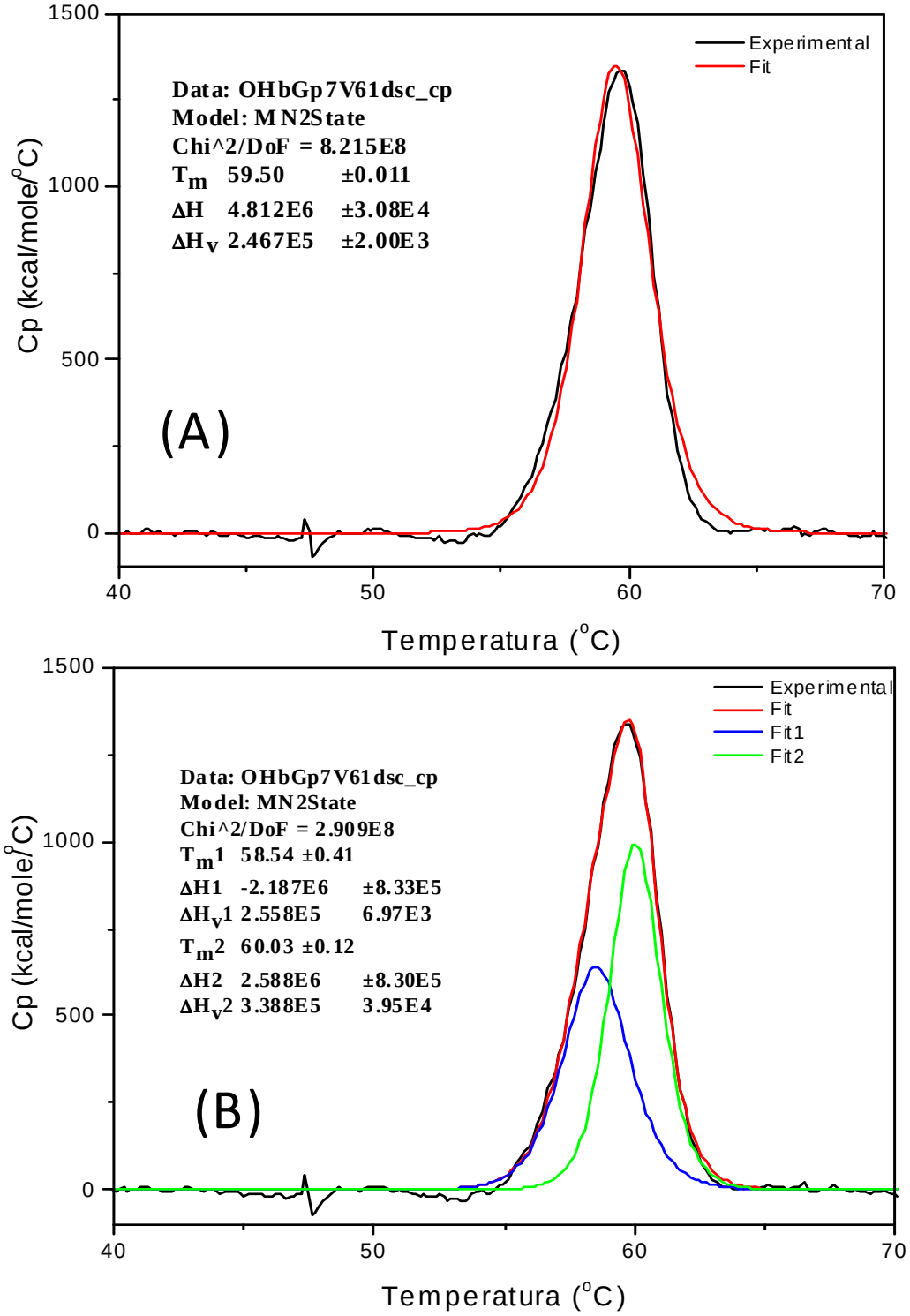


Figura 18: A ajuste do termograma da oxi-HbGp no pH 7,0 utilizando o software *origin* com uma transição (A) e com duas transições (B).

.

5.1.2 Estudo da estabilidade térmica da HbGp nas formas oxi-, meta- e cianometa- em solução ácida, neutra e básica, utilizando microcalorimetria diferencial de varredura (DSC).

Os estudos de desnaturação/agregação térmica por DSC com a oxi-, meta- e cianometa-HbGp, no meio ácido mostram que a HbGp apresenta grande estabilidade térmica, e um termograma com um pico de transição endotérmico, como mostram os termogramas da Figura 19A. Esses termogramas mostram ainda que em meio ácido as formas cianometa- e oxi-HbGp são mais estáveis do que a meta-HbGp, e que as três formas de HbGp formam agregados na faixa 70-90 ^{o}C sendo observados vários picos exotérmicos nesse intervalo de temperatura [36,37]. Essa tendência da HbGp em formar agregados em meio ácido quando submetida a condições desnaturantes é condizente com estudos anteriores realizados com a HbGp [54]. Essa classe de proteína gigante possui ponto isoéletrico (pI) ácido em torno de 5.5, e por isso, em meio ácido no pI as diferenças de cargas eletrostáticas existentes na superfície da HbGp é nula, criando uma situação favorável á formação de agregados de proteína [53,54,] .

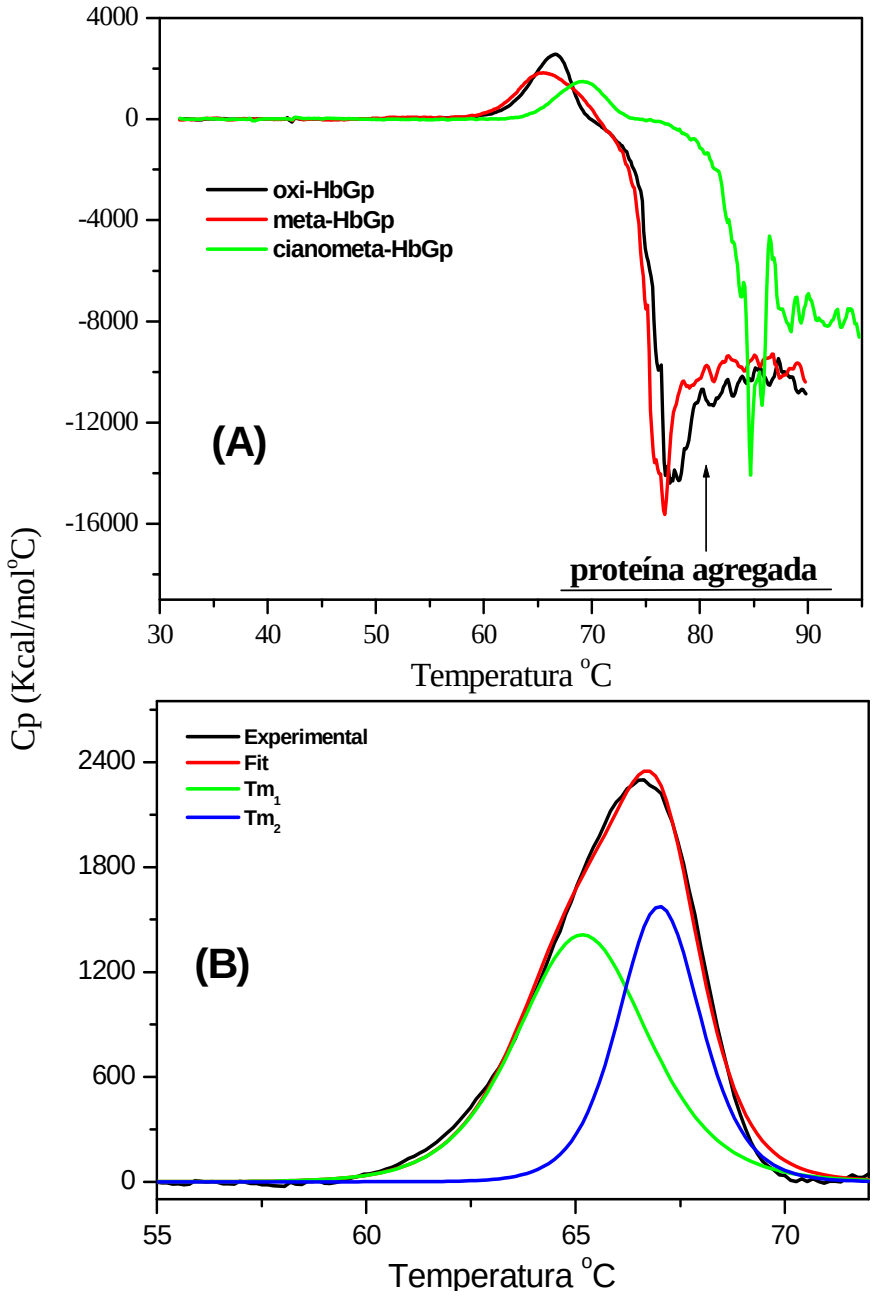
O ajuste do pico de transição do termograma da HbGp usando o modelo de Sanchez-Ruiz [31] com duas transições, é mostrado para a oxi-HbGp na Figura 19B. Nesse ajuste é obtido a primeira transição T_m1 em 65,2 ± 0,1 ^{o}C e a segunda transição T_m2 em 67,0 ± 0,1 ^{o}C. Os demais parâmetros obtidos com o ajuste estão reunidos na Tabela 3.

As transições do ajuste são atribuídas a mudanças de conformação na estrutura oligomérica, como mudanças conformacionais que levam a perda da estrutura de bicamada hexagonal na primeira transição, e a segunda transição corresponde ao rearranjo das estruturas que se encontram parcialmente desnaturadas e à formação de agregação de proteína [10,36,37]. Tendo em vista, que em estudos por DLS no meio ácido, pH 5,4 e 6,1, a HbGp se mantêm estável até 55 ^{o}C havendo a formação no meio de agregados de tamanho crescente com o aumento da temperatura atingindo um tamanho máximo de raio hidrodinânico de 3000 nm no pH 5,4 e 2650 nm no pH 6,0, sendo que inicialmente, o raio hidrodinâmico antes de alcançar a temperatura critica é de 27 nm. Dessa forma, acredita-se que antes de se agregar a HbGp perde a conformação em bicamada hexagonal [10], como, por exemplo, a separação dessa estrutura em duas metades dando origem à estruturas parcialmente desnaturadas e como o pH está próximo do ponto isoelétrico e a temperatura elevada induz a formação de agregados [29,54]. A tendência da HbGp de formar agregados grandes em pH ácido próximo ao pI também foi determinada por absorção óptica. Para tanto, realizou-se aquecimento por um período de uma hora no intervalo de temperatura crítico de maior agregação, entre 50 - 70 ^{o}C, e depois de resfriada a temperatura ambiente e equilibrada pelo mesmo tempo, a amostra foi centrifugada e medida a absorção óptica do sobrenadante. Dessa forma, é obtida uma porcentagem de redução da absorção que é atribuída a agregação/precipitação a 70 ^{o}C maior que 80 % nos valores de pH 5,0 e 6,0 [54].

Alguns autores propõem que a agregação ocorre após a desnaturação da proteína, tendo em vista, que é necessária a exposição de estruturas (resíduos) hidrofóbicos ao solvente (H_2O) que se encontram inicialmente no interior da

estrutura, para que a molécula desnaturada seja induzida pelo solvente a adotar conformações que protejam essas estruturas da repulsão da água formando agregados e que, dependendo do pH, podem formar–se agregado grandes [36-40].

Fodor e colaboradores [53] observaram em estudos por DSC que a proteína Na, K-ATPase da glândula salina do tubarão e do rim do porco também forma agregado com o aumento de temperatura quando em pH ácido e próximo ao pI e essa tendência em formar agregados dessas proteínas foi atribuída à mudanças conformacionais em função da temperatura dos vários domínios, e também, às cargas na superfície que favorecem a agregação.



.

Figura 19: Termogramas de desnaturação da HbGp nas formas oxi-, meta- e cianometa, concentração 0,5 mg/mL em solução tampão fosfato-acetato 20 mmol/L de pH 5,0 com razão de aquecimento 1,0 °C/min. (A) Curvas experimentais da oxi-, meta- e cianometa-HbGp no intervalo de temperatura 30-95 °C. (B) Ajuste da curva experimental com o modelo de não dois estados com duas transições. O mesmo ajuste mostrado para a oxi-HbGp foi realizado para a meta- e cianometa-HbGp e os dados obtidos com esses ajustes estão reunidos na Tabela 3. Nesses ajustes realizados com a oxi-,meta- e cianometa-HbGp no meio ácido (pH 5,0 e 6,0), foi considerado apenas o pico endotérmico do termograma.

Os termogramas obtidos no pH 7,0 com a HbGp são mostrados na Figura 20. Nota-se que a oxi-HbGp apresenta um pico de transição mais fino do que o pico apresentado no meio ácido com transição em temperatura um pouco menor. O pico de transição mais fino apresentado pela oxi-HbGp sugere que nessa condição de pH os vários domínios do oligômero possuem termo-estabilidades mais próximas, transicionando numa pequena faixa de temperatura, resultando em um pico mais cooperativo [42,55-57].

A cianometa-HbGp apresenta termograma com pico de transição composto por no mínimo duas transições, em temperatura maior. A transição da cianometa-HbGp composta por, no mínimo, duas transições evidencia a contribuição do pH para a estabilidade térmica dos diferentes domínios através de mudanças conformacionais levando parte dos domínios a se desnaturarem em temperaturas diferentes. Essa diferença de estabilidade de parte do oligômero pode estar associada a mudanças de cargas eletrostáticas na superfície da proteína levando a alterações das forças de interação entre as subunidades [53].

A meta-HbGp é a menos estável no pH 7,0 possuindo termograma também composto por dois picos de transição, o que sugere que as alterações das forças de interação entre as subunidades induzido pelo pH são mais fortes, do que na cianometa-HbGp [40,54]. As mudanças conformacionais mais intensas na meta-HbGp podem ser atribuídas a maiores mudanças na quantidade de cargas eletrostáticas, do que na oxi- e cianometa-HbGp. Isto produz uma maior heterogeneidade de estabilidade dos domínios do oligômero resultando na diminuição da estabilidade térmica e no surgimento de várias transições no termograma [33-35,54].

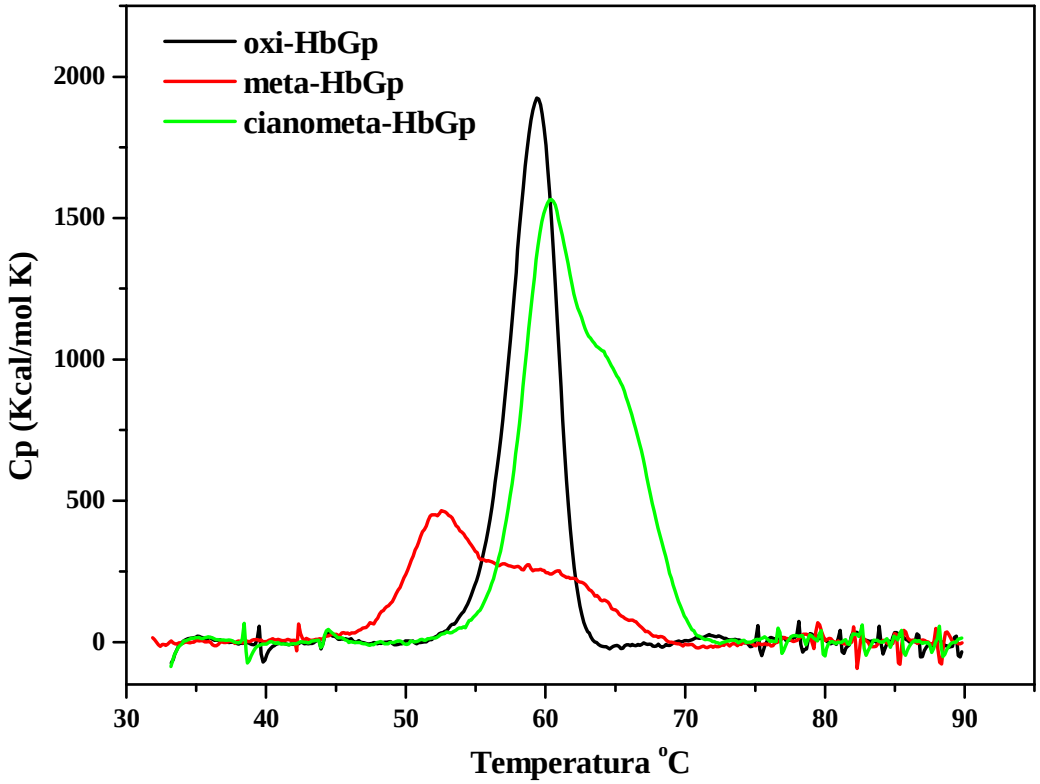


Figura 20: Termogramas de desnaturação da HbGp nas formas oxi-, meta- e cianometa-. Concentração 0.5 mg/mL em solução tampão fosfato-borato 20 mM e valore de pH 7,0.

Nos ajustes dos termogramas no pH 7,0 mostrados na Figura 21 a oxi-HbGp apresenta T_m1 em 58,3 ± 0,3 °C e T_m2 em 60,0 ± 0,1 °C,e a cianometa-HbGp é um pouco mais estável apresentando T_m1 em 59,3 ± 0,1 e T_m2 em 64,6 ± 0,1 °C e a meta-HbGp é a menos estável apresentado transições em temperaturas menores como pode ser visto na Tabela 3. Esses valores de Tm da HbGp são bem menores do que os valores encontrados para as hemocianinas *Rapana thomasiana* (83 e 90 °C) [33] e *Concholepas concholepas* (82, 83 e 94 °C) [57] que são proteínas oligoméricas como a HbGp, e esses valores de Tm da HbGp corroboram com resultados anteriores [54,55].

As diferenças nos termogramas no pH 7,0 apresentados pela oxi-, meta- e cianometa-HbGp podem ser atribuídas a diferentes níveis de complexidade do processo de desnaturação, seguido por cada forma de HbGp e da influência do pH do meio [42,44, 54].

Os termogramas da oxi-, meta- e cianometa-HbGp embora sejam diferentes, se ajustaram bem com duas transições, sugerindo que, mesmo possuindo diferença de complexidade no processo de desnaturação e Tm, a transição continua sendo composta por duas transições. Essas transições podem ser atribuídas a processos de perda da estrutura oligomérica seguida de desnaturação dessas estruturas. A primeira transição T_m1 ocorre 58.3 ± 0.3 ^oC para a oxi-HbGp sendo atribuída à desnaturação parcial do oligômero, e a segunda transição T_m2 em 60.0 ± 0.1 ^oC corresponde a desnaturação irreversível dos vários domínios da HbGp [53,54].

Essa diferença de complexidade do processo de desenovelamento térmico de acordo com o estado de oxidação do ferro e do tipo de ligante ligado a sexta coordenação do ferro do grupo heme é consistente com estudos de melting por DLS. Estes estudos mostraram que em pH 7,0 a oxi-, meta- e cianometa-HbGp formam estruturas com diferentes raios hidrodinâmicos e todas as três formas não se dissociam, mas se desnaturam numa temperatura crítica acima de 50 ^oC. No entanto, a meta-HbGp se desnatura formando estruturas de tamanhos variados com raio hidrodinâmico máximo de 90 nm. A cianometa-HbGp também se desnatura e forma estruturas com raio maior que 200 nm [54]. A oxi-HbGp desnaturada forma estruturas menores com raio hidrodinâmico de 65 nm [54]. Dessa forma, acredita-se que essas diferenças de termograma podem estar associadas a diferentes processos de desenovelamento das diferentes formas de HbGp. A segunda

transição do ajuste do termograma da meta- e cianometa-HbGp pode ser atribuída à desnaturação de domínios que permanecem no meio na forma parcialmente desnaturada e que no DLS são vistos como agregados, uma vez que, não é observado nenhum pico exotérmico referente à formação dessas estruturas de agregados no DSC [53,54].

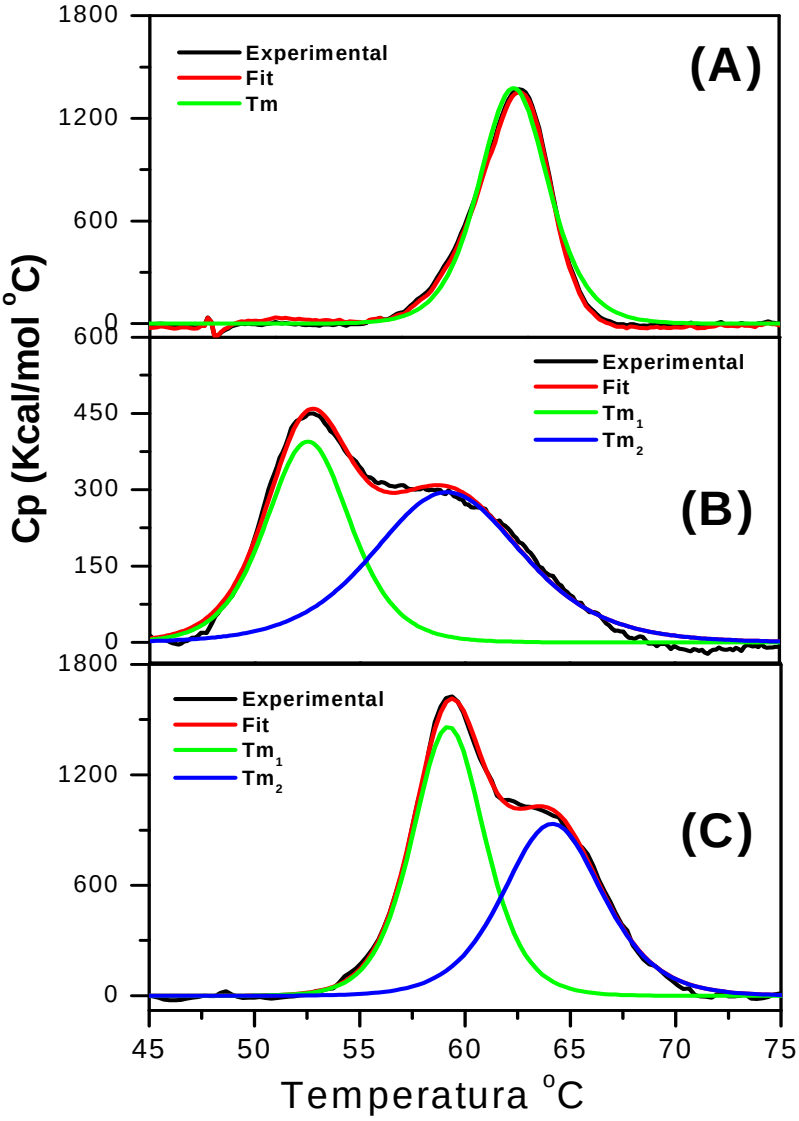


Figura 21: Ajustes das curvas experimentais com o modelo de não dois estados, com duas transições para (A) oxi-, (B) meta- e (C) cianometa-HbGp no pH 7,0. Os dados obtidos com os ajustes encontram-se reunidos na Tabela 3.

No pH 8,0 a HbGp apresenta menor estabilidade térmica dentre os pHs estudados e a complexidade do termograma aumenta em relação a meio ácido e neutro. Com o aumento do número de transições no caso da oxi-HbGp e a melhor definição das duas transições na meta- e cianometa-HbGp em relação ao pH 7,0.

A oxi-HbGp no pH 8,0 apresenta termograma composto por dois picos de transições, possuindo um pico mais fino intenso próximo a 50 ^{o}C e outro pico mais largo em torno 60 ^{o}C. Da mesma forma, meta- e cianometa-HbGp que já apresentavam indícios de duas transições no pH 7,0, no pH 8,0 essas transições estão melhores definidas como pode ser visto na Figura 22**.** Os termogramas compostos por dois picos de transição no pH 8,0 evidenciam que em meio alcalino as três formas de HbGp sofrem dissociação oligomérica [29,54]. A HbGp em meio alcalino se dissocia em dodecâmero, trímeros, monômeros, e linkers como mostram estudos por cromatografia de gel filtração [15,29].

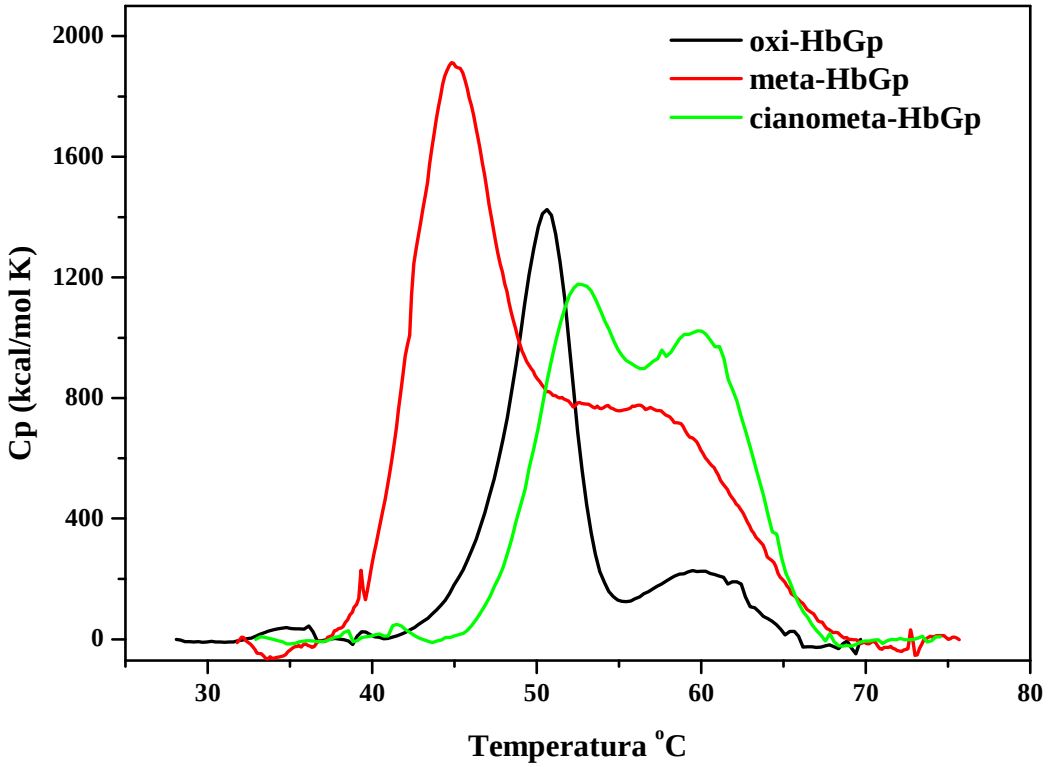


Figura 22: Termogramas de desnaturação da HbGp nas formas oxi, meta e cianometa, concentração 0.5 mg/mL em solução tampão fosfato-acetato-borato 20 mmol/L, pH 8,0 com razão de aquecimento 1 °C/min.

Na Figura 23 são mostrados os ajustes realizados para a oxi-, meta- e cianometa-HbGp no pH 8,0. A forma oxi-HbGp apresenta duas transições em menores temperaturas de T_m1 48,6 ± 0,5 °C e T_m2 50,7 ± 0,1 e uma terceira transição em T_m3 de 59,4 ± 0,1°C. Essas transições são atribuídas a processos de dissociação oligomérica e na temperatura mais alta à desnaturação das subunidades, respectivamente [29,54]. No caso da meta- e cianometa-HbGp acredita-se que as duas transições representam os mesmos processos sofridos pela forma oxi, sendo que o estado de oxidação e o ligante ligado ao ferro na sexta coordenação do grupo heme deve conferir dinâmica de desnaturação diferentes resultando em duas transições.

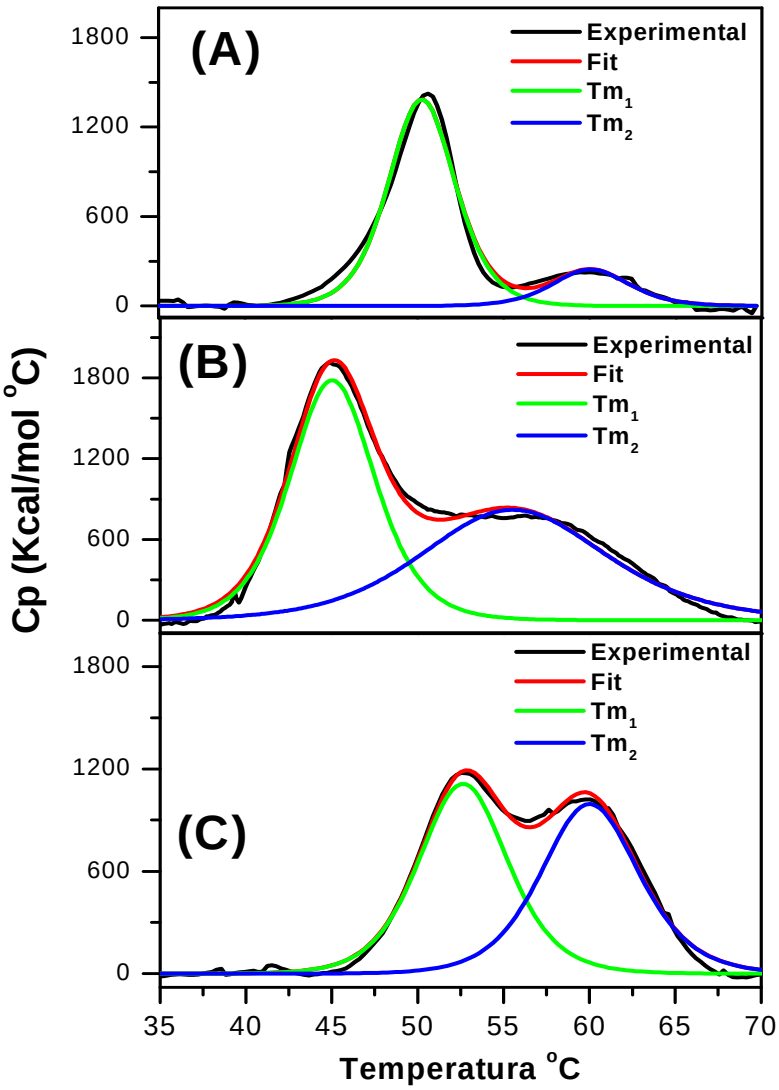


Figura 23: Ajustes das curvas experimentais usando o modelo de não dois estados com transições independentes para oxi-, meta- e cianometa-HbGp no pH 8,0. Ajuste com três transições para a oxi-HbGp (A), e com duas transições, meta-(B) e cianometa-HbGp (C).

Na Tabela 3 são mostrados os valores de Tm, de variação de entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) e da razão ΔH_{cal}/ ΔH_{vH} nos diferentes pHs estudados. A ordem de estabilidade térmica seguida é cianometa-> oxi->meta-HbGp sendo que os valores de Tm decrescem com o aumento de pH do meio. Essa redução dos valores

de Tm com o pH evidencia a diminuição das forças de interação entre os domínios da HbGp resultando num processo de desenovelamento mais complexo como indicam os valores das razões $\Delta H_{cal}/ \Delta H_{vH}$.

Os valores das razões $\Delta H_{cal}/ \Delta H_{vH}$ da HbGp são bastante elevados e muito maiores do que os relatados na literaturas para proteínas menores, e que foram usados na análise dos termogramas através do mesmo modelo usado para analisar os termogramas da HbGp, como, por exemplo, a albumina do soro bovina (BSA) [44] que apresenta valor máximo da razão $\Delta H_{cal}/ \Delta H_{vH} = 2,3$. Entretanto, os valores da razão $\Delta H_{cal}/ \Delta H_{vH}$ da HbGp são muito maiores evidenciando que o processo de desnaturação da HbGp é muito mais complexo . Tal fato é condizente com a estrutura oligomérica da HbGp devido ao grande número de subunidades de diferente grau de complexidade [10,13].

Os valores das razões $\Delta H_{cal}/ \Delta H_{vH}$ bastante elevados, além de indicar que o processo de desnaturação da oxi-, meta- e cianometa-HbGp é bem complexo, também sugere que a estrutura oligomérica possui grande quantidade de estrutura polares, ou seja, é muito rica em ligações de hidrogênio, resultando em valores de ΔH_{cal} de ordem de grandeza MJ/mol. A exposição dessas estruturas polares é maior em meio alcalino nas três formas de HbGp estudadas indicando que o pH do meio é um fator determinante no processo de desnaturação e solvatação do oligômero desnaturado [42].

As diferenças dos valores de ΔH_{cal} nos diferentes pHs e das diferentes formas de HbGp pode ser atribuída a fatores relacionados com as cargas e ao tipo de estrutura assumida pelos diversos domínios na forma desnaturada, ou seja, quanto maior o número de cargas presentes e quanto mais ficarem os domínios

desnaturados e expostos ao solvente, mais solvatados serão e maiores os valores de entalpia [40,42].

Tabela 3: Temperaturas de transição (Tm) da HbGp nas formas oxi, cianometa, e meta na concentração 0,5 mg/mL com razão de aquecimento de 1.0 ^{o}C/min na faixa de pH 5,0-8,0

pH	T_m1 °C	ΔH1 (MJ/mol)	$\Delta H_{vH}1$ (MJ/mol)	ΔH1/ $\Delta H_{vH}1$ (MJ/mol)	T_m2 °C	ΔH2 (MJ/mol)	$\Delta H_{vH}2$ (MJ/mol)	ΔH2/ $\Delta H_{vH}2$ (MJ/mol)	ΔH_{cal} (MJ/mol)
oxi-HbGp									
5,0	65,2 ± 0,6	9 ± 3	0,8 ± 0,1	11,2	67,0±0,2	8,0 ± 3	1,2 ± 0,2	6.7	17 ± 6
6,0	65,8 ± 0,5	28 ± 6	2,0 ± 0,4	14	67,8 ±0,1	18 ± 6	2,0 ± 0,4	9	46 ±12
7,0	60,2 ± 0,2	23 ± 3	1±0,1	23					23 ± 3
8,0	50,3±0,1	30±3	0,7±0,01	42,8	60,1 ± 0,1	6 ± 1	1 ± 0,1	6,3	41 ± 7
cianometa-HbGp									
5,0	68,0 ± 0,2	37 ± 4	0,6±o,1	61	70,4 ± 0,2	3 ± 1	2 ± 1	1,5	40 ± 5
6,0	67,4 ± 0,1	10 ± 2	1±0,1	10	69,3 ± 0,1	50 ± 4	0,52 ± 0,1	96	60 ± 6
7,0	59,3 ± 0,1	26 ± 4	1±0,1	26	64.6 ± 0.1	26 ± 3	0,6 ± 0,1	43,3	52 ± 7
8,0	53,0 ± 0,1	27 ± 1	0,5±0,1	54	60±0.1	31±2	0,5±0,01	62	58 ± 4
meta-HbGp									
5,0	65,0±0,2	32 ± 8	0,8 ± 0,1	40	68,1 ± 0,1	9 ± 2,0	1 ±0,1	9	41 ± 10
6,0	62,1±0,2	55 ± 4	0,6 ± 0,01	96,7	66,6 ± 0,3	7 ± 2	1,2±0,4	5,8	62 ± 7
7,0	52,5±0,1	10 ± 1	0,6 ± 0,01	16,7	60,1 ± 0,1	10 ± 1	0,6 ± 0,01	16,7	20 ± 2
8,0	45,1±0,1	54 ± 5	0,5 ± 0,01	108	55,7 ± 0,1	90 ± 6	0,2 ± 0,1	450	140 ± 11

5.1.3. Estudo do comportamento cinético do processo de desnaturação térmica da oxi- e cianometa-HbGp em valores de pH 7,0 e 8,0.

A Figura 23 mostra os resultados do estudo do comportamento cinético do processo de desnaturação térmica da oxi- e cianometa-HbGp, em concentração 0, 5 mg/mL, em pH 7,0 e 8,0, com razões de aquecimento entre 0,5, e 1,5 ^{o}C/min. Nesses termogramas é observado que à medida que a razão de aquecimento da amostra aumenta, a temperatura de transição (Tm) se desloca para valores de temperatura mais altos. Esses resultados caracterizam que o processo de desnaturação da oxi- e cianometa-HbGp corresponde a um processo cineticamente controlado, ou seja, isso significa que a temperatura de transição é dependente da razão de aquecimento da amostra.

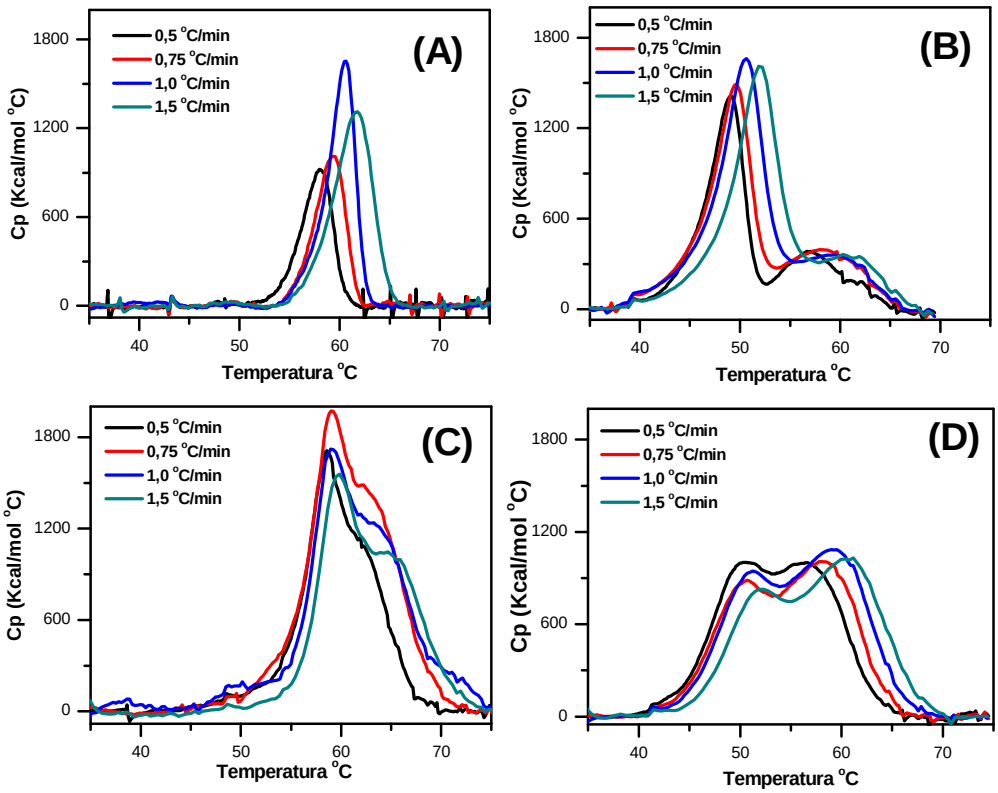


Figura 23: Termogramas da oxi- e cianometa-HbGp na concentração 0,5 mg/mL, em tampão fosfato-borato 20 mmol/L, pH 7,0 e 8,0, com razão de aquecimento de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 °C/min no intervalo de temperatura 30-90 °C. No pH 7,0 (A) oxi-HbGp, (B) cianometa-HbGp. No pH 8,0 (C) oxi-HbGp e (D) cianometa-HbGp.

Os termogramas com várias razões de aquecimento foram ajustados com base no modelo de Sanchez-Ruiz [31] para a obtenção dos parâmetros necessários para o cálculo da energia de ativação uma vez que o processo de desnaturação não é do tipo de dois estados. Alguns dos ajustes são mostrados na Figura 24, sendo que os valores de Tm obtidos correspondentes a cada transição foram usados para construir o gráfico de Arrhenius mostrado na Figura 25.

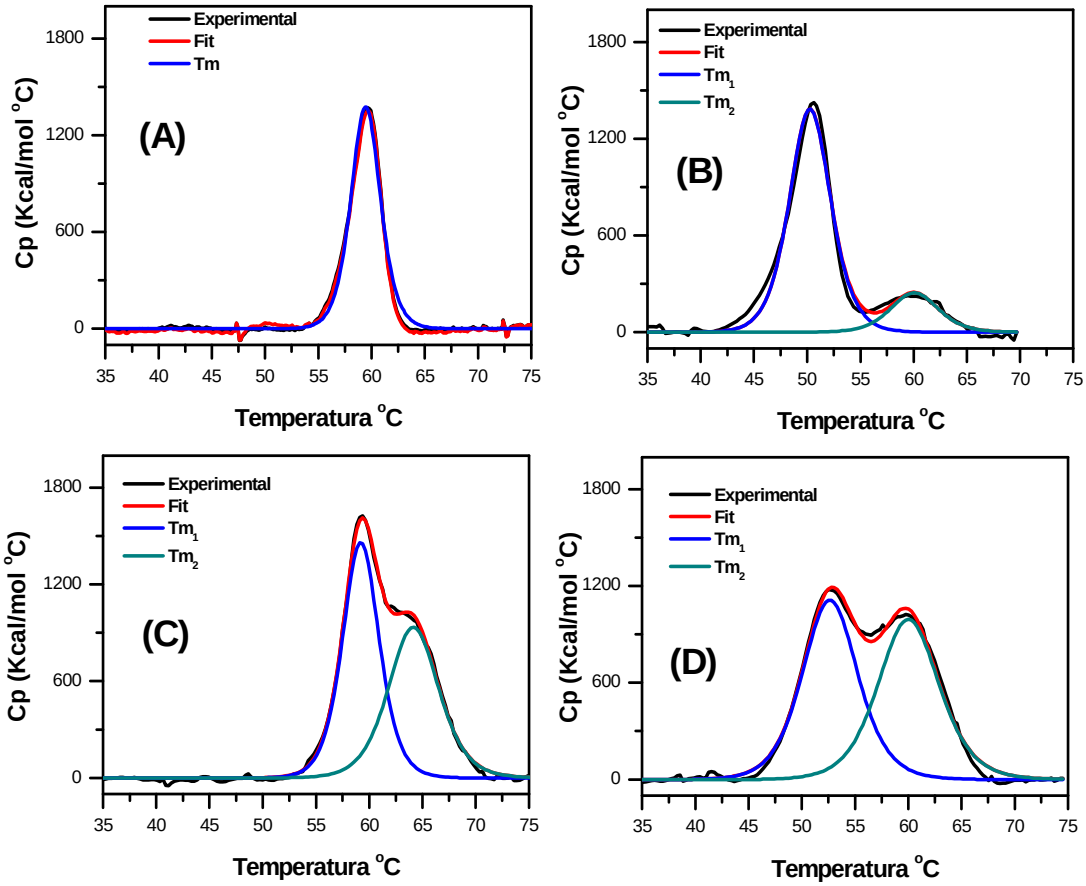


Figura 24: Ajustes dos termogramas de oxi e cianometa-HbGp na concentração 0,5 mg/mL no pH 7,0 e 8,0, em tampão fosfato-20 mmol/L de borato, razão de aquecimento 1,0 ^{o}C/min com duas transições e com três transições para oxi-HbGp no pH 7,0 e 8,0 e com duas transições para cianometa-HbGp nos dois valores de pH. Os dados termodinâmicos obtidos com os ajustes estão reunidos na Tabela 4.

Com os gráficos de Arrhenius da Figura 25 foram determinados os valores de energia de ativação, baseado na função razão de aquecimento sobre o quadrado de Tm (v/Tm^2) versus (1/Tm). Nesse gráfico a inclinação da reta é igual a –Ea/R, sendo E_a a energia de ativação, R constante dos gases ideais. Dessa forma, cada transição no ajuste com razão de aquecimento de 0,5 a 1,5 ^{o}C/min possui um valor de Tm e corresponde uma reta correspondente traçada no gráfico de Arrhenius com quatro pontos, resultando num número de valores de energias de ativação igual ao número de

transições no ajustes das curvas experimentais e de retas traçadas nos gráficos da figura abaixo. Os valores de energia de ativação estão mostrados na Tabela 4 [31].

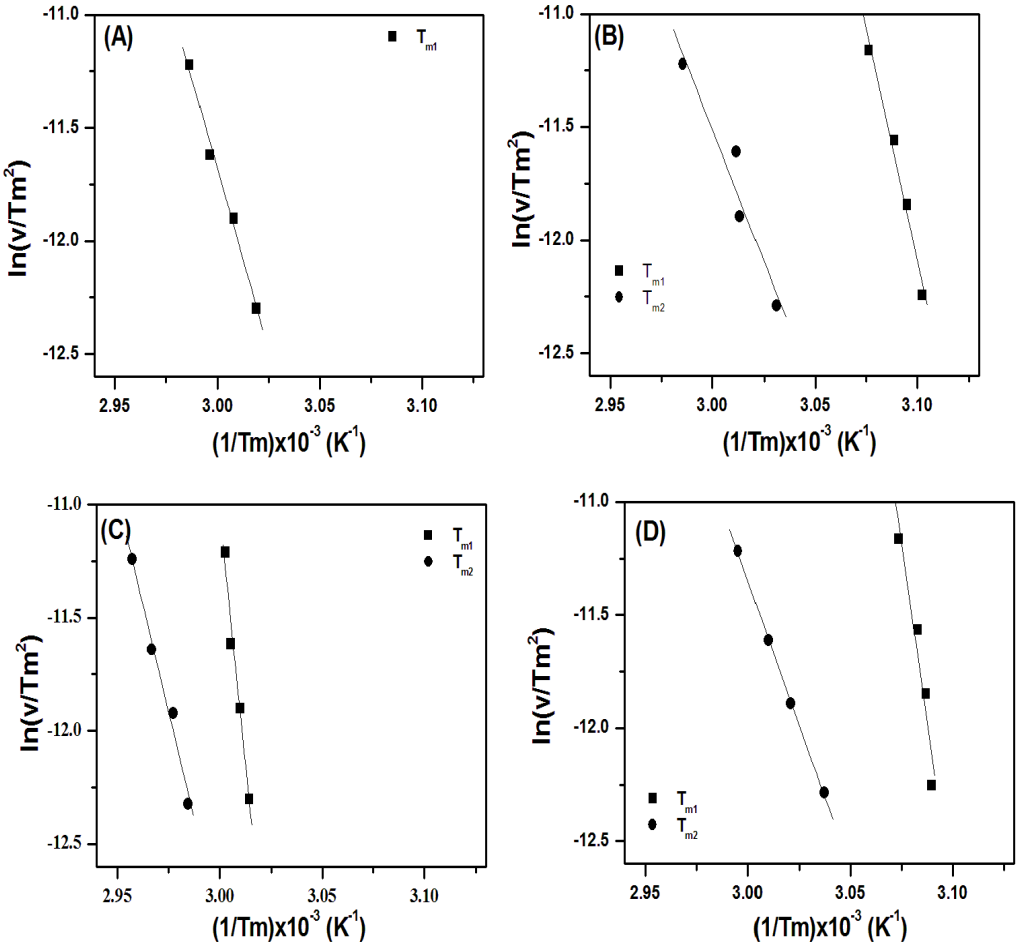


Figura 25 Gráficos de Arrhenius utilizadas na estimativa da energia de ativação da desnaturação térmica irreversível de oxi-HbGp em pH 7,0 (A) e 8,0 (B) e cianometa-HbGp em pH 7,0 (C) e 8,0 (D), nas concentrações 0,5 mg / mL. A energia de ativação E_a corresponde a inclinação da reta do gráfico de Arrhenius (veja equação 10), e Tabela 4.

Os valores de energia de ativação total encontrados para a oxi e cianometa-HbGp no pH 7,0 apresentados na Tabela 4 são menores do que os encontrados para hemocianinas dos moluscos marinhos *Rapana thomsiana* (1212 ± 45 KJ/mol)

[33] e da *Concholepas concholepas* (1208 ± 12 KJ/mol) [58] que são proteínas semelhantes à HbGp em termos de complexidade de estrutura oligomérica. Entretanto, a energia de ativação de HbGp é maior do que os valores reportados na literatura para proteínas de estrutura mais simples como a ovalbumina 490 KJ/mol [36], e L-2-Hidroxisocaproate dehidrogenase que apresenta E_a de 361 KJ/mol [37] evidenciando que a HbGp é cineticamente bastante estável o que corrobora com trabalhos anteriores.

Alguns autores tais como Rodriguez-Larrea col. [59] e Sanchez-Ruiz [45] definem a energia de ativação como o grau de solvatação/dessolvatação da proteína no meio aquoso, ou seja, como grau de proteção da proteína pelas moléculas de água, criando dessa forma uma barreira energética em oposição ao desenovelamento da proteína denominada de “barreira de solvatação”. Assim, quanto mais solvatada for a proteína no meio, maior será sua energia de ativação. Nesse contexto, a cianometa-HbGp é melhor solvatada do que a oxi-HbGp.

Tabela 4: Energia de ativação (kJ / mol) e temperaturas de transição (Tm) da oxi e cianometa-HbGp 1,0 ^{o}C/min em valores de pH 7,0 e 8,0 obtidos a partir de dados de DSC, em velocidades de varredura na faixa de 0,5 a 1,5 oC/min

pH	T_{m1}(^{o}C)	E_{a1}	T_{m2}(^{o}C)	E_{a2}	T_{m3}(^{o}C)
			oxi-HbGp		
7.0	60,2 ± 0.5	260 ± 15			260 ± 15
8.0	50,6 ± 0,3	339 ± 34	58,9 ± 0,1	196 ± 36	535 ± 70
			cianometa-HbGp		
7.0	60,1 ± 0,2	453 ± 90	65,3 ± 0,2	386 ± 31	839 ± 121
8.0	52,1 ± 0,2	561 ± 171	60,7 ± 0,3	288 ± 32	849 ± 203

A Tabela 5 mostra os valores de variação de entalpia do processo de desnaturação térmica da oxi- e cianometa-HbGp no pH 7,0 e 8,0, com diferentes valores de razão de aquecimento obtidos com os ajustes mostrados na Figura 24. Os valores de variação de entalpia são um pouco maiores no pH 8,0 sugerindo que o processo de desnaturação térmica em meio alcalino leva a maiores mudanças na estrutura da proteína, e que a mesma é melhor solvatada quando desenovelada do que no pH 7,0 os efeitos de desnaturação por temperatura e pH se somam [25].

Outro fato importante a ser ressaltado é que os valores da variação de entalpia do processo de desnaturação térmica da oxi- e cianometa-HbGp não possuem

dependência linear com o aumento da taxa de aquecimento, evidenciando que no processo cinético de desnaturação térmica irreversível da HbGp, não há equilíbrio na transição entre as formas nativa-desnaturada [32]. Essa não linearidade da entalpia com a cinética de desnaturação tem sido relatada na literatura [25,32] como sendo devido a ausência de equilíbrio entre os dois estados no processo de desnaturação quando o processo de desnaturação é irreversível. Nesse caso, na transição só há no sistema a coexistência de quantidades de proteína nas formas nativa e desnaturada, sem a conversão de uma forma na outra, ou seja, a forma desnaturada não se transforma na forma nativa. Com isso, os valores de variação de entalpia não dependem da razão de aquecimento do sistema [25, 32].

Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação da oxi-e cianometa-HbGp obtidos a partir do ajuste dos termogramas com duas e três transições independentes em valores de pH 7,0 e 8,0

Razão de aquecimento (^oC/min)	Tm_1 (^oC)	ΔH_1 (MJmol $^{-1}$)	Tm_2 (^oC)	ΔH_2 (MJmol $^{-1}$)	ΔH(Total) (MJmol^{-1})
			oxi-HbGp-pH7,0		
0,5	57,7 ± 0.1	15 ± 2	-	-	15 ± 2
0,75	59,0 ± 0.1	16 ± 2	-	-	16 ± 2
1,0	60,2 ± 0.2	23 ± 3			23 ± 3
1,5	61,3 ± 0.1	27 ± 3			27 ± 3
			oxi-HbGp-pH8,0		
0,5	48,5 ± 0,1	28 ± 4	57,8±0,1	11 ± 2	39 ± 6
0,75	49,1 ± 0,1	34 ± 5	59,0 ± 0,2	13 ± 2	47 ± 7
1,0	50,3 ± 0,1	30 ± 1	60,1 ± 0,2	6 ± 1	36 ± 2
1,5	51,7 ± 0,1	41 ± 2	61,3 ± 0,2	10 ± 2	41 ± 5
			Cianometa-HbGp-pH7,0		
0,5	58,5 ± 0,1	33 ± 2	62,6 ± 0,1	21 ± 3	54 ± 5
0,75	58,6 ± 0,1	28 ± 3	63,6 ± 0,1	24 ± 3	52 ± 6
1,0	59,3 ± 0,1	26 ± 4	64,6 ± 0,1	26 ± 3	52 ± 7
1,5	60,5 ± 0,1	27 ± 2	65,7 ± 0,1	21 ± 3	48 ± 5
			Cianometa-HbGp-pH8,0		
0,5	51,0 ± 0,1	37 ± 2	57,8 ± 0,1	27 ± 2	64 ± 4
0,75	55,6 ± 0,1	25 ± 1	59,5 ± 0,1	26 ± 1	51 ± 2
1,0	56,0 ± 0,1	27 ± 1	61,5 ± 0,1	31 ± 1	58 ± 2
1,5	56,6 ± 0,1	23 ± 1	61,7 ± 0,1	31 ± 1	54 ± 2

5.2.0 Estudos da estabilidade térmica da oxi- e cianometa-HbGp utilizando Dicroísmo Circular (CD).

5.2.1 oxi-HbGp

A Figura 26 mostra os espectros de (CD) de oxi-HbGp no intervalo de temperatura 25 a 75 ^{o}C, apresentando a elipticidade em função do comprimento de onda, no pH 6,0 e 7,0. Nessa figura são mostrados os espectros separadamente na região das ligações peptídicas (195 - 250 nm), e na região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos (250 - 500 nm). O monitoramento da estrutura secundária da HbGp foi realizado com o intuito de investigar o processo de desenovelamento térmico e o efeito do pH.

Os espectros mostram a oxi-HbGp na forma nativa a 25 ^{o}C, tendo na região das ligações peptídicas, sinal de elipticidade de valor negativo com uma banda em 222 nm correspondente às estruturas peptídicas em forma de hélices-α. São mostrados também, espectros da região do grupo heme com valores de elipticidade positiva com máximo em 415 nm (pH 7,0) que é característica da forma oxi-HbGp e bandas entre 250-300 nm que corresponde ao sinal de assimetria dos aminoácidos aromático [51,52].

No pH 6,0 (Figura 26 A) na região das ligações peptídicas observa-se que a proteína se mantém estável até 50 ^{o}C, não apresentando perdas significativas de sinal referentes às estruturas secundárias comparada a 25 ^{o}C. Mas o sinal é reduzido abruptamente em 55 ^{o}C sugerindo que essa proteína gigante perde sua estrutura secundária de forma cooperativa, ou seja, ela mantêm toda a sua estrutura organizada

até uma certa temperatura e essa organização é perdida simultaneamente pela maioria dos domínios protéicos. Na região espectral que correspondente ao grupo heme e aos aminoácidos aromáticos (Figura 26B), pode ser notado que até 40 ^{o}C o grupo heme também se mantêm estável. No entanto, a partir de 45 ^{o}C ocorre um deslocamento do comprimento de onda do máximo da banda de Soret de 412 nm, a 25 ^{o}C para, 434 nm. A banda em 434 nm aumenta de intensidade de 50 a 60 ^{o}C comparado ao espectro a 45°C, e acima de 60 ^{o}C há a perda da banda em 434 nm indicando a desnaturação da espécie formada e das hélices-α da proteína.

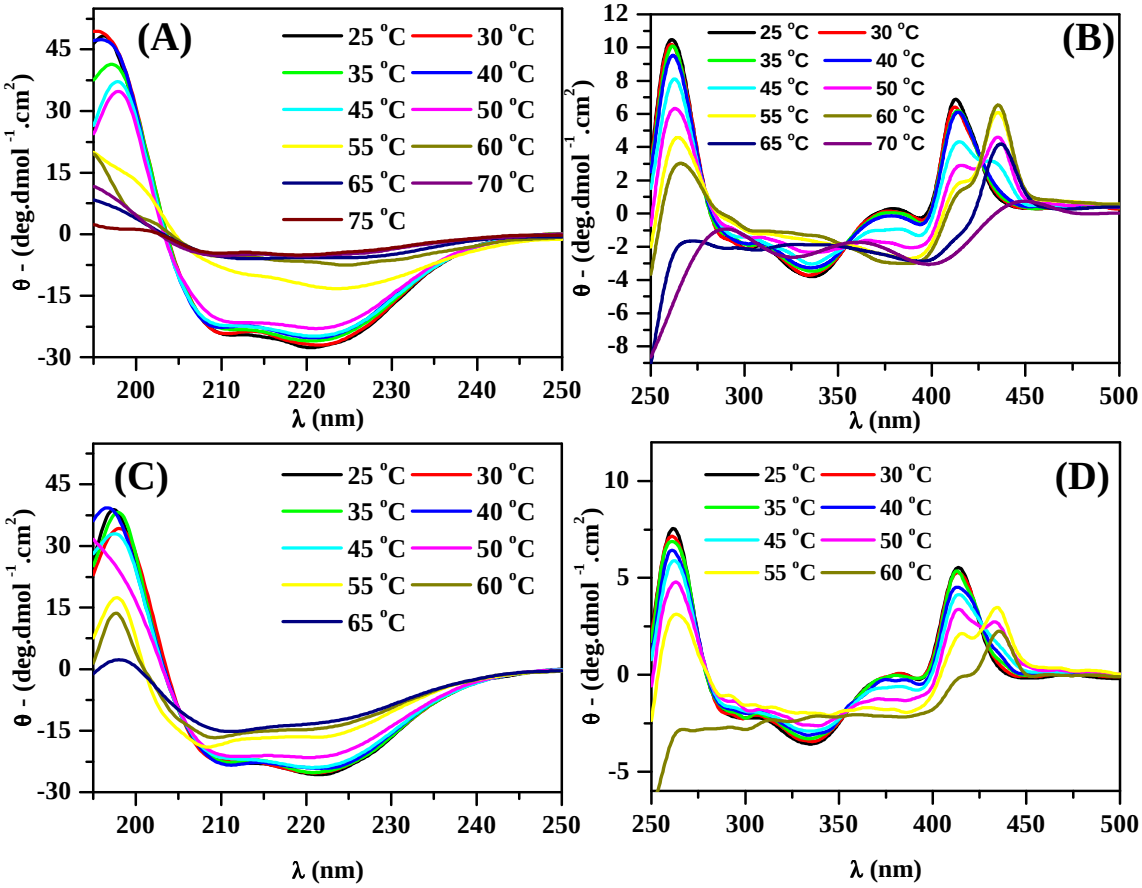


Figura 26: Espectros de dicroísmo circular (CD) da oxi-HbGp, no pH 6.0 (A), pH 7.0 (C) nas regiões das ligações peptídicas na concentração de 0,2 mg/mL, e pH 6,0 (B), pH 7.0 (D) região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos concentração 3,0 mg/mL. Faixa de temperatura 25 - 75 ^{o}C.

O comportamento espectral da oxi-HbGp no pH 7,0, Figura 26C e 26D, é semelhante ao observado no pH 6,0. Na região das ligações peptídicas a perda de elipticidade com o aumento de temperatura ocorre de forma mais gradual, diferente do meio ácido em que ocorrem mudanças abruptas. A estabilidade térmica do grupo heme também é semelhante ao do meio ácido, ocorrendo praticamente o mesmo deslocamento da banda de Soret, que inicialmente tinha máximo em 415 nm, e é deslocada para 434 nm antes de se desnaturar.

O deslocamento da banda de Soret para 434 nm no pH 6,0 e 7,0 é atribuído a processos de auto-oxidação da oxi-HbGp com o aumento da temperatura, levando à formação de espécie oxidada hemicromo, que é quando a sexta coordenação do ferro no estado de oxidação Fe^{3+} passa a ser ocupada pelo nitrogênio do imidazol da histidina distal, formando um complexo bis-histidina [18]. Dessa forma, acredita-se que a espécie hemicromo formada no pH 6,0 e 7,0 seja a mesma devido a que a banda de Soret esteja centrada em 434 nm. A formação dessa espécie foi caracterizada em trabalhos anteriores com a oxi-HbGp na presença de surfactante [18]. O hemicromo formado se mostra bastante estável e induz fortes mudanças na quantidade de hélices-α, sugerindo que a coordenação do imidazol da histidina distal acarreta mudanças conformacionais importantes na estrutura global da HbGp.

Na Figura 27 são mostrados os espectros de CD da oxi-HbGp no pH 8,0 e 9,0 em função do aumento de temperatura. Na região das ligações peptídicas (Figura 27A e 27C) a elipticidade diminui de forma mais progressiva a partir de 45 ^{o}C, sendo que as menores reduções da elipticidade ocorrem no pH 9,0. Na região do grupo heme no pH 8,0 (Figura 27B) o sinal é perdido totalmente entre 50 e 55 ^{o}C de forma

abrupta. No pH 9,0 (Figura 27D) ocorrem reduções de sinal do heme de forma progressiva e mais lenta até a temperatura final de 45 ^{o}C.

Essas diferenças de perda de elipticidade nos pHs 8,0 e 9,0 sugerem diferentes graus de dissociação oligomérica sofridos pela oxi-HbGp em função da temperatura, originando subunidades menores tais como o dodecâmero, trímero e monômero [15,18,29,54]. A perda de elipticidade de forma mais abrupta na região do grupo heme no pH 8,0 acompanhada por mudanças nas hélices-α sugere que a oxi-HbGp não se encontra totalmente dissociada, tendo em vista, que essa perda de sinal do heme de forma rápida sugere processos de mudanças comformacionais de forma cooperativa entre os vários domínios do oligômero [29]. Também é conhecido que as subunidades da HbGp possuem estabilidades diferentes como mostrado em estudo do comportamento cinético de auto-oxidação. Após a dissociação alcalina o monômero se mostra mais estável do que o trímero por não apresentar processo cooperativo de auto-oxidação [18]. Dessa forma, quando a HbGp se encontra totalmente dissociada a perda de estrutura secundária é mais lenta devido as diferenças de estabilidade entre as subunidades no meio.

A dissociação oligomérica também leva a mudanças de assimetria dos aminoácidos aromáticos como pode ser observado nas bandas em 260 e 335 nm, que se tornam mais intensas, sugerindo que a estrutura dos aromáticos são mais expostos ao solvente e a alta hidrofobicidade dessas estruturas induz a mudanças de conformação e assimetria (Figura 27B e 27D).

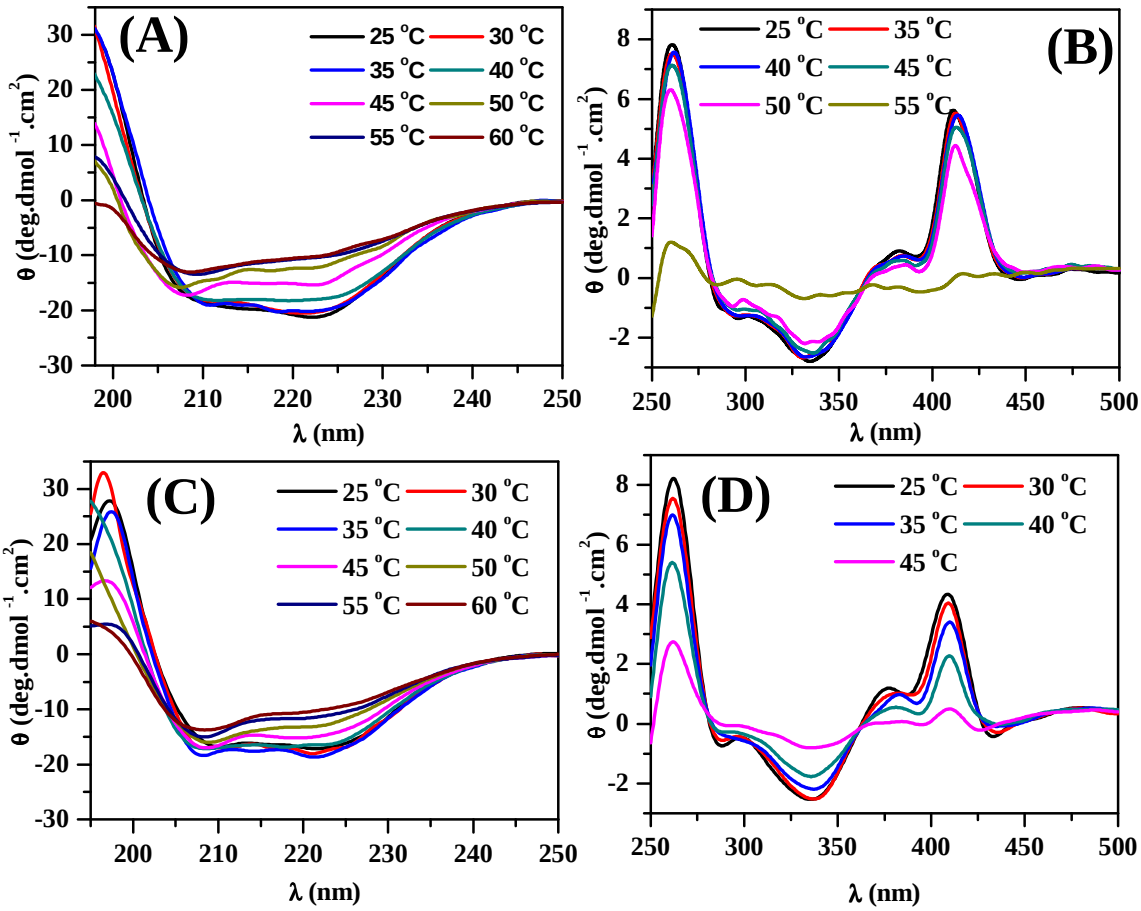


Figura 27: : Espectros de dicroísmo circular (CD) da oxi-HbGp, no pH 8.0 (A), pH 9.0 (C) região das ligações peptídicas, concentração 0,2 mg/mL. pH 8,0 (B), pH 9.0 (D) na região do grupo heme e dos aminoácidos, aromáticos concentração 3,0 mg/mL. Faixa de temperatura 25-60 ^{o}C.

5.2.2 Cianometa-HbGp

No monitoramento da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD) da cianometa-HbGp com o aumento de temperatura e em função do pH, na região das ligações peptídicas, foi utilizada metade da concentração usada na oxí-HbGp, e na região do grupo heme a concentração de proteína foi idêntica. A necessidade de uma menor concentração sugere que a cianometa-HbGp possui uma maior quantidade de estrutura secundária comparada a forma oxi-HbGp.

A Figura 28 mostra os espectros de CD da cianometa-HbGp no pH 6,0 e 7,0 com as bandas características a 25 ^{o}C da espécie nativa com valores de elipticidade negativa na região peptídica em hélices-α em 222 nm, uma banda positiva na região do grupo heme a 420 nm (banda de Soret) e dos aminoácidos aromáticos entre 250-350 nm, característica de globina na forma enovelada [51]. Diferente da oxi-HbGp a forma cianometa não apresenta ombros negativos entre 250 – 350 nm, sugerindo mudanças de assimetria dos aromáticos induzido pela força do ligante cianeto ligado a sexta coordenação do ferro do heme.

Na figura 28A e 28B são mostrados os espectros no pH 6,0 na região dos peptídeos e do heme, onde pode ser notado que as hélices-α se mantém estáveis até 60°C, ocorrendo uma redução de 64 % da elipticidade em 222 nm entre as temperaturas de 65 e 70 ^{o}C. O grupo heme apresenta comportamento semelhante aos peptídeos, com redução gradativa de elipticidade da banda de Soret, perdendo 71 % do sinal entre 25 e 70 ^{o}C, com uma perda de 50 % da elipticidade entre 65 e 70 ^{o}C. Essa grande perda de estruturas em hélices-α e do heme sugere a existência de cooperatividade no processo de desnaturação, como observado para a oxi-HbGp. No entanto, na cianometa-HbGp a perda de elipticidade ocorre a uma temperatura 10 ^{o}C maior nas hélices-α do que a oxi-HbGp, evidenciando que o ligante cianeto torna a HbGp mais estável.

No pH 7,0, Figuras 28C e 28D, a perda de estrutura em hélices-α e do heme é mais lenta, com perda total de 55 % e 76 % no intervalo 25-65 ^{o}C respectivamente. Essa perda de elipticidade ocorre de forma mais lenta nas hélices-α e no heme sugerindo que a desnaturação è menos cooperativa do que no meio ácido.

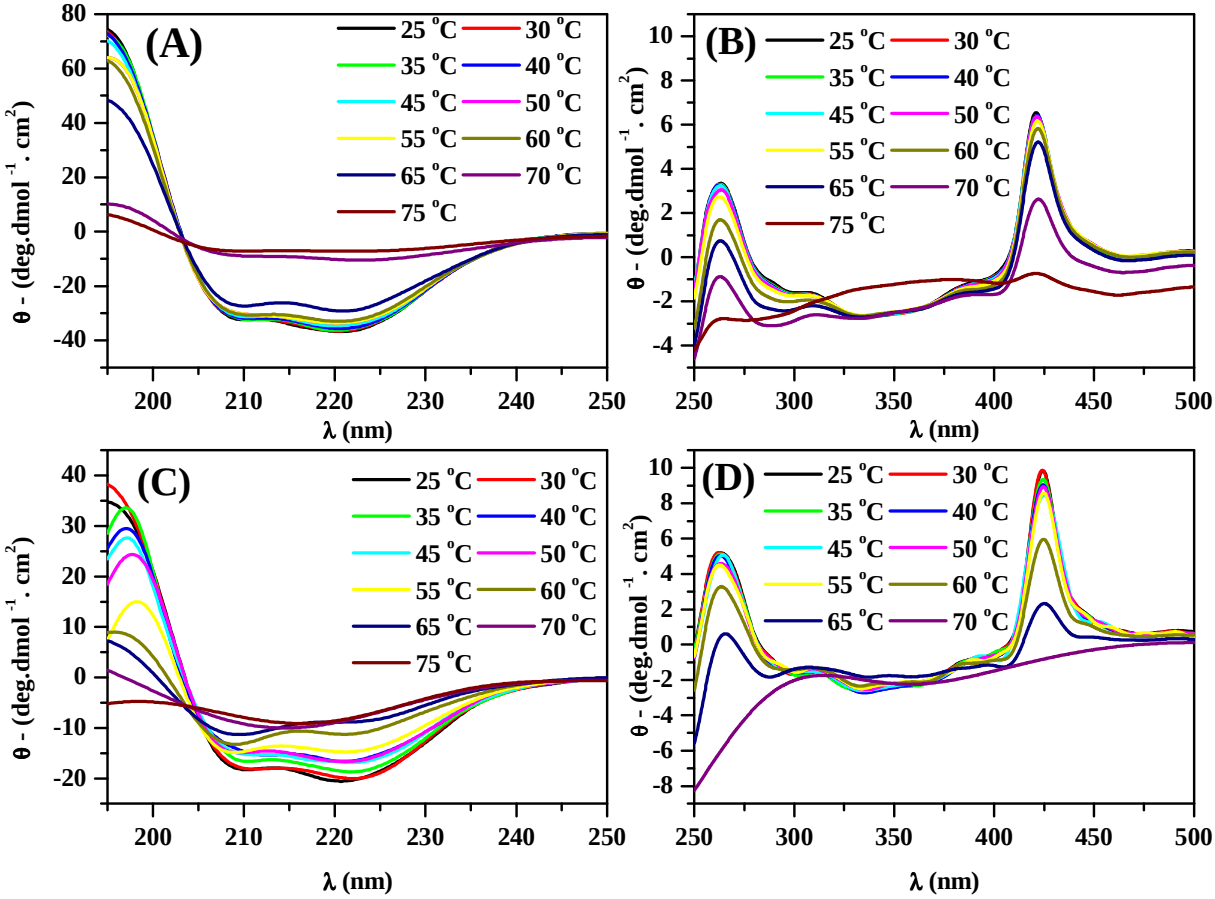


Figura 28: Espectros de dicroísmo circular (CD) da cianometa-HbGp, no pH 6.0 (A), pH 7.0 (C) região das ligações peptídicas, concentração 0,1 mg/mL. pH 6,0 (B), pH 7.0 (D) na região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos, concentração 3,0 mg/mL. Faixa de temperatura 25 -75 °C.

No meio alcalino (pH 8.0 e 9,0), Figura 29, a cianometa-HbGp apresenta menor estabilidade térmica e menor quantidade de estruturas secundárias. A diminuição da quantidade de estrutura secundária com a elevação do pH é atribuída a mudanças conformacionais no oligômero induzida pelo pH alcalino e a tendência do oligômero em se dissociar com a temperatura. Entretanto, a elipticidade do grupo heme não muda significativamente, o que significa dizer que as mudanças conformacionais ocasionadas pelo pH não modificam significativamente a assimétria do ferro do heme.

A perda de elipticidade nos peptídeos no pH 8,0 e 9,0 corresponde a cerca de 32 e 31 % quando comparado a 25 ^{o}C a temperatura final, respectivamente. No grupo heme a perda de elipticidade é total no mesmo intervalo de temperatura. No pH 8,0 um comportamento semelhante ao da forma oxi-HbGp é observado, sendo que a perda de sinal mais abrupta ocorre entre 45 e 50 ^{o}C, com a redução de 71 % entre 25 a 55 ^{o}C. Essa mudança sugere que nessa temperatura ocorre a dissociação oligomerica da cianometa-HbGp antes de se desnaturar completamente.

No pH 9,0 a perda de sinal do grupo heme mais gradual evidenciando que a cianometa-HbGp nesse pH se encontra bem mais dissociada do que no pH 8,0, e assim como na oxi-HbGp essa redução gradativa da elipticidade da banda de Soret deve-se às diferentes estabilidades das subunidades dissociadas no meio que se desnaturam em diferentes temperaturas e nesse caso a perda de sinal do grupo heme entre 25 e 55 é de 66 %.

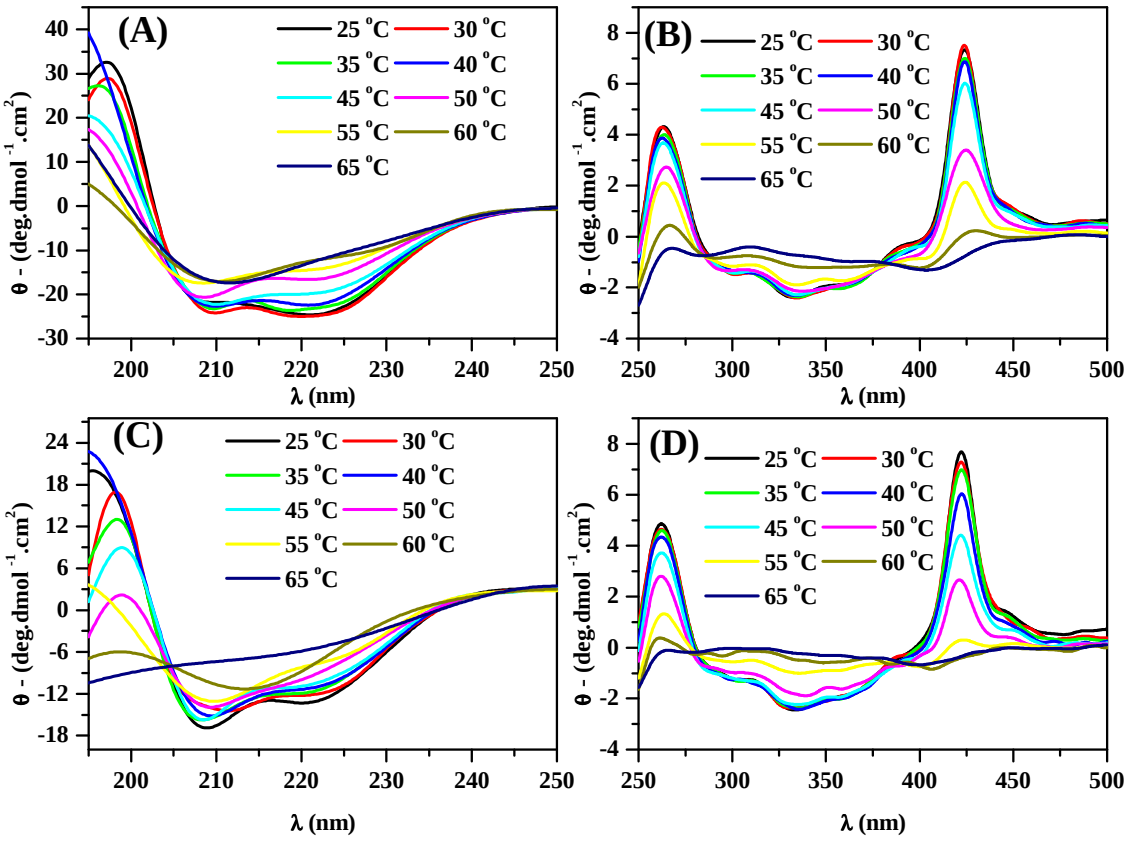


Figura 29: Espectros de dicroísmo circular (CD) da cianometa-HbGp, no pH 8.0 (A), pH 9.0 (C) na região das ligações peptídicas, concentração 0,1 mg/mL. pH 8,0 (B), pH 9.0 (D) na região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos, concentração 3,0 mg/mL. Faixa de temperatura 25 -65 ^{o}C.

No processo de desnaturação da cianometa-HbGp não há evidências da formação de outras espécies, tal como o hemicromo, mostrando ainda diferenças nas bandas entre 300 e 400 nm correspondentes a movimentos vibracionais da estrutura do grupo heme. É observado que as bandas com elipticidade negativa em 345 nm e de valor positivo em 375 nm na cianometa-HbGp são bem menos intensas do que na oxi-HbGp (Figura 29B e 29D). Essa diferença de intensidade de bandas entre a oxi- e a cianometa-HbGp indica que quando o cianeto é coordenado ao ferro do heme o ligante induz mudanças de conformação da vizinhança, nesse caso diminui a vibração das estruturas que compõem o grupo heme, modificada pela

força de ligação do cianeto [5]. O ligante CN^- também induz nos aminoácidos aromáticos uma conformação diferente devido às bandas em 260 nm serem mais intensas do que na oxi-HbGp. Dessa forma, acredita-se que essas mudanças conformacionais causadas pelo ligante cianeto são responsáveis pelo ganho de estrutura peptídica na região das hélices-α e a maior resistência á temperatura por formar uma estrutura mais compacta.

5.2.3 Fração de desnaturação (Fu) e temperatura crítica (Tc) obtidos da estrutura secundária da oxi- e cianometa-HbGp monitoradas por dicroísmo circular (CD).

Na Figura 30 são mostradas as frações de desnaturação da HbGp em função da temperatura nos vários pHs estudados. Esses gráficos foram construídos com os dados de elipticidade da oxi- e cianometa-HbGp em 222 nm que corresponde ao sinal das hélices-α e do máximo da banda de Soret em cada pH estudado. A partir do gráfico da fração de desnaturação em função da temperatura foi determinado o valor de temperatura crítica em função do pH. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 6. Nesse cálculo foi assumido que o processo de desnaturação da HbGp segue um modelo de dois estados e foi usada a equação 11 [48]. A temperatura crítica corresponde ao ponto onde 50 % da estrutura secundária da HbGp se encontra na forma nativa (enovelada) e 50 % na forma desnaturada ou desenovelada, ou seja, é a temperatura em que o F_u é igual a 0,5.

A fração de desnaturação mostra a seguinte ordem decrescente de estabilidade térmica em função do pH para a oxí e cianometa-HbGp: pH6,0 > pH 7,0 > pH 8,0 > pH 9,0, respectivamente.

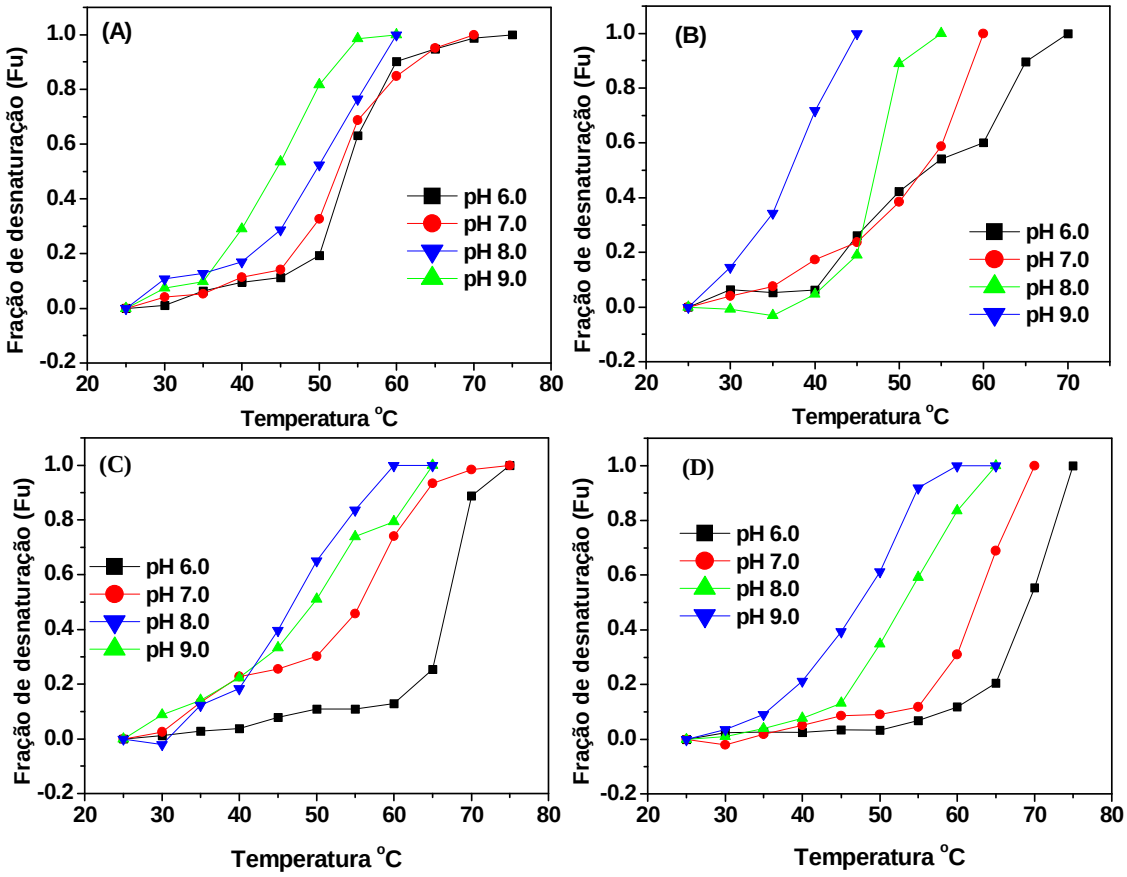


Figura 30: Fração de desnaturação da HbGp na faixa de pH 6.0 a 9.0, no intervalo de temperatura 25-75 °C. Oxi-HbGp (A) região peptídica e (B) região do grupo heme e aminoácidos aromáticos. Cianometa-HbGp região peptídica (C) e (D) região do grupo heme e aminoácidos aromáticos.

Outro fato a ser ressaltado é que em ambas as regiões de monitoramento, na região peptídica e dos grupos hemes, a oxi-hbGp possui, praticamente, os mesmos valores de temperatura crítica, em meio ácido e neutro, evidenciando grande homogeneidade entre os vários domínios nessas condições. A oxi-HbGp apresenta no pH 6,0 um valor Tc de 53,6 °C e no pH 7,0 um valor de 52,5 °C, valores muito maiores do que o valo reportado na literatura para a hemoglobina humana que é de

37 ^{o}C [52]. Por outro lado, esses valores são semelhantes aos valores obtidos usando a técnica de espalhamento de luz dinâmico DLS para a oxi-HbGp [29,54]. No entanto, à medida que o meio se torna alcalino a diferença de temperatura crítica entre os domínios peptídicos e dos grupos hemes, aumenta tornando-se cerca de 1,5 ^{o}C. Essas diferenças de Tc entre os peptídeos e os grupos heme evidencia o efeito na estabilidade das várias subunidades com a dissociação oligomérica [15,18,29], desestabilizando mais o grupo heme do que as estruturas em hélices-α.

Tabela 5: Temperatura crítica Tc (^{o}C) da HbGp nas formas oxi- e cianometa-, para a região peptídica (hélices-α 222 nm) e região do grupo heme (banda de Soret) no intervalo de pH 6,0 ao 9,0

pH	oxi-HbGp peptídeos	oxi-HbGp banda de Soret
6,0	53,6	53,3
7,0	52,3	52,5
8,0	49,5	47,2
9,0	44,4	37,1
pH	**cianometa-HbGp peptídeos**	**cianometa-HbGp banda de Soret**
6,0	66,8	69,1
7,0	55,7	62,4
8,0	49,5	53,0
9,0	47,0	47,4

O erro nos valores da tabela acima é aproximadamente ± 0,5 ^{o}C.

Na cianometa-HbGp a temperatura critica também diminui com o aumento de pH, entretanto, os valores de temperatura crítica para as hélices-α e o grupo heme

possuem uma diferença de 2,3 ^{o}C no pH 6,0 (Tabela 6). O grupo heme tem os maiores valores de Tc, mas com a elevação do pH, essa diferença de temperatura crítica diminui entre as duas estruturas se tornando praticamente igual no pH 9,0. Essa diferença de temperatura crítica entre o grupo heme e as hélices-α sugere que a cianometa-HbGp possui estrutura oligomérica mais heterogênea do que a oxi-HbGp e essa heterogeneidade é atribuída ao ligante cianeto (CN-) ligado ao ferro do heme que torna mais difícil a desnaturação dessa estrutura, mas com a dissociação oligomérica a estabilidade entre essas estruturas torna-se muito próxima.

5.3.0 Estudo por espectroscopia de absorção óptica no ultravioleta-visível com a hemoglobina do *Glossoscolex paulistus* nas formas oxi, cianometa- e meta-HbGp

5.3.1. oxi-HbGp.

A Figura 31 mostra os espectros de absorção óptica da oxi-HbGp íntegra na região do ultravioleta-visível em pH 5,0, 7,0 8,0 e 9,0, em função da temperatura. Inicialmente é observado um espectro característico da oxi-HbGp nativa a 25 ^{o}C, apresentando comprimento de onda com máximo da banda de Soret em 415 nm (pH7,0), e as bandas α e β em 540 nm e 575 nm [18,29].

No pH ácido a oxi-HbGp se mantém praticamente estável até 50 ^{o}C havendo poucas mudanças espectrais, até a formação de agregados em temperaturas maiores que 65 ^{o}C. No entanto, essa pequena diminuição de intensidade na banda de Soret é associada a auto-oxidação do ferro do grupo heme com o aumento de

temperatura, formando espécies oxidadas tais como o hemicromo, que é um complexo bi-histidina, caracterizado pelo deslocamento da banda de Soret para o azul (Figura 31A) e bandas Q centradas em comprimento de onda 535 e 565 nm [18], respectivamente, como pode ser melhor visualizado na Figura 32A. No meio ácido, oxi-HbGp forma agregados grandes em temperaturas maiores que 55 ^{o}C e esses agregados formados são visíveis quando a amostra é removida da cubeta após o aquecimento.

No pH 7,0 (Figura 31B) a oxi-HbGp é menos estável, e acima de 50 ^{o}C, as bandas de Soret e bandas Q diminuem de intensidade e se deslocam de forma progressiva indicando que a auto-oxidação é maior, do que, no meio ácido formando maior quantidade de espécies oxidadas (Figura 32B, [18]).

No meio básico (pH 8,0 e 9,0) as mudanças espectrais ocorrem em temperatura mais baixa: observa-se a redução da intensidade e o alargamento da banda de Soret, sugerindo que o processo de desnaturação térmica em solução alcalina envolve a formação de mais espécies oxidadas como o hemicromo, aquometa e espécies pentacoordenadas, principalmente no pH 9,0 [18,60-62]. Essas modificações espectrais são mais fortes em meio alcalino, com a formação de maiores quantidades de hemicromo, aquometa e espécies pentacoordenadas, o que é atribuído à dissociação oligomérica que facilita a formação dessas espécies como mostrado em trabalhos anteriores [18, 60]. A dissociação oligomérica promove a formação de maior quantidade de espécies hemicromo, aquometa e pentacoordenadas, devido ao acesso de moléculas de água ao bolsão hidrofóbico do grupo heme ser maior e a interação eletrostática das moléculas de água com a

densidade eletrônica do átomo de ferro aumentar a taxa de auto-oxidação levando à formação de várias espécies oxidadas no meio [60-65].

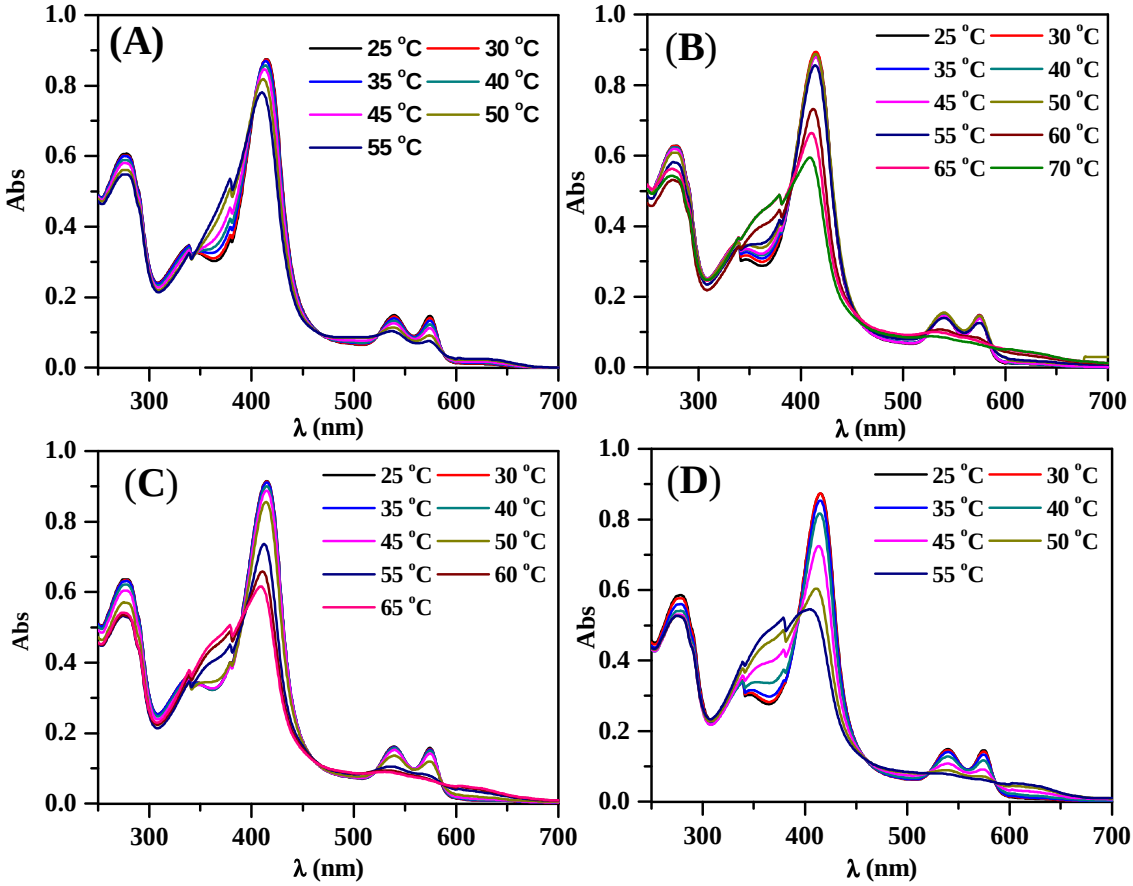


Figura 31: Espectros de absorção óptica no ultravioleta-visível da oxi-HbGp, concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de temperatura 25 - 70 °C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH 9,0.

A Figura 32 mostra com mais detalhe as bandas Q da oxi-HbGp no meio ácido, neutro e básico em função da temperatura, sendo observado, que com o aumento da temperatura o surgimento de uma banda em 625 nm que é atribuída à forma oxidada aquometa-HbGp. No meio ácido pode ser visto que a auto-oxidação é menor devido à banda em 625 nm ser menos intensa. No entanto, essa banda aumenta de intensidade no meio neutro e alcalino devido ao aumento da auto-

oxidação nesses pHs com o aumento da temperatura [60,61]. A banda em torno de 625 nm é atribuída a forma aquometa-HbG, no entanto, ela se desloca para comprimentos de onda próximos de 600 nm conforme o pH vai aumentando, sugerindo a formação de espécies pentacoordenadas no meio, sendo nesse caso, a espécie pentacoordenada uma forma parcialmente desnaturada da HbGp (Figura 32, [18,29]).

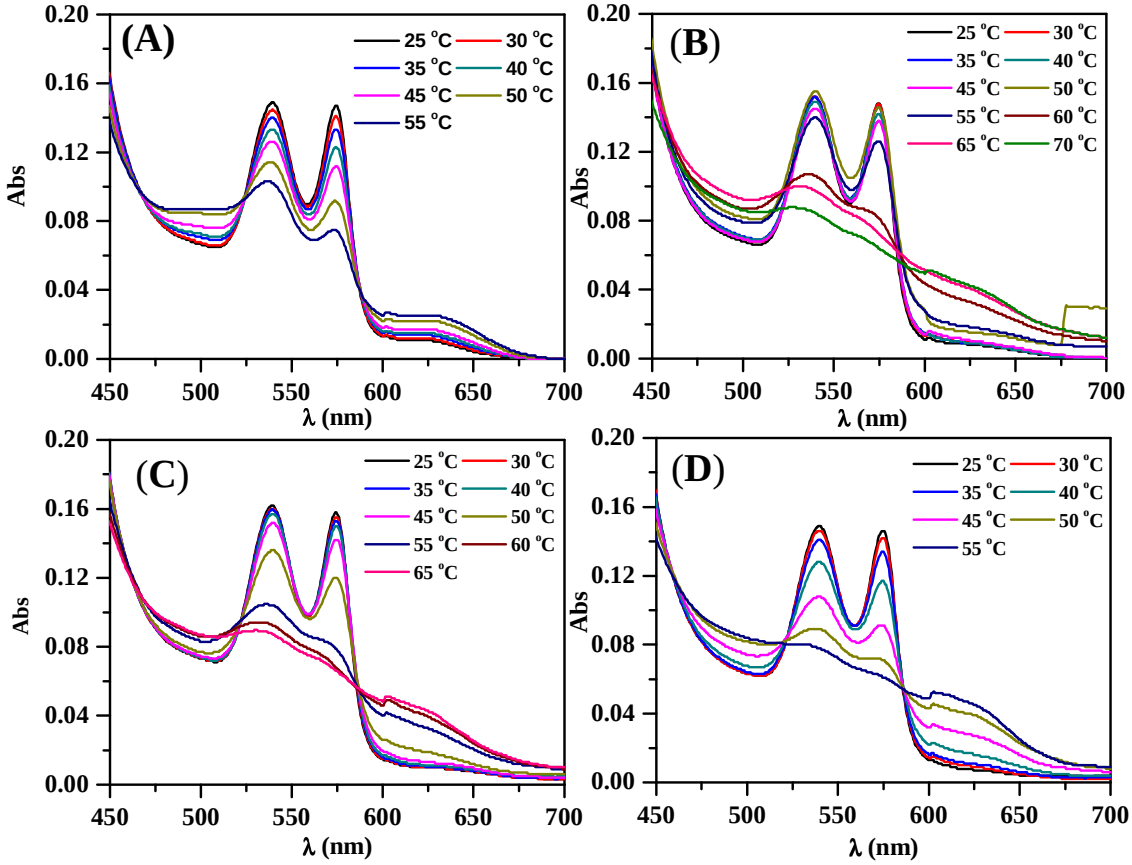


Figura 32: Espectros de absorção óptica das bandas Q no visível da oxi-HbGp, concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de temperatura 25-70 °C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH 9,0.

Analisando o deslocamento do λ_{max} da banda de Soret e da absorbância em 415 nm em função da temperatura nos vários pHs mostrados na Figura 33 pode ser

notado seguinte: nos pHs λ^{Soret}_{max} permanece constante em torno de 415 nm até cerca de 50 ^{o}C. Acima dessa temperatura há um decréscimo de λ^{Soret}_{max} chegando a 408 nm a 65 ^{o}C no pH 8,0 e a 70 ^{o}C em pH 7,0. Em pH 9,0 a diminuição de λ^{Soret}_{max} ocorre em temperatura mais baixa a partir de 45 ^{o}C.

No meio ácido, em pH 6,0 e 5,0, a diminuição de λ^{Soret}_{max} é menos acentuado (mais suave) chegando a 410 - 411 nm na temperatura de 55 ^{o}C. O comportamento da absorbância em 415 nm (Figura 33B) é bastante similar á descrita para λ^{Soret}_{max}. A diminuição λ^{Soret}_{max} nas temperaturas mais elevadas alcançando comprimentos de ondas de 408 nm e 410 - 411 nm sugerem a formação de hemicromo e aquometa-HbGp [60]. No pH 9,0 o λ^{Soret}_{max} se desloca para comprimentos de onda menores em temperaturas menores, chegando a 403 nm nas temperaturas mais altas e uma banda de Soret bem larga, é consistente com a coexistência de espécies hemicromo, aquometa e pentacoordenada no meio, formando um equilíbrio complexo [18,29,62-67].

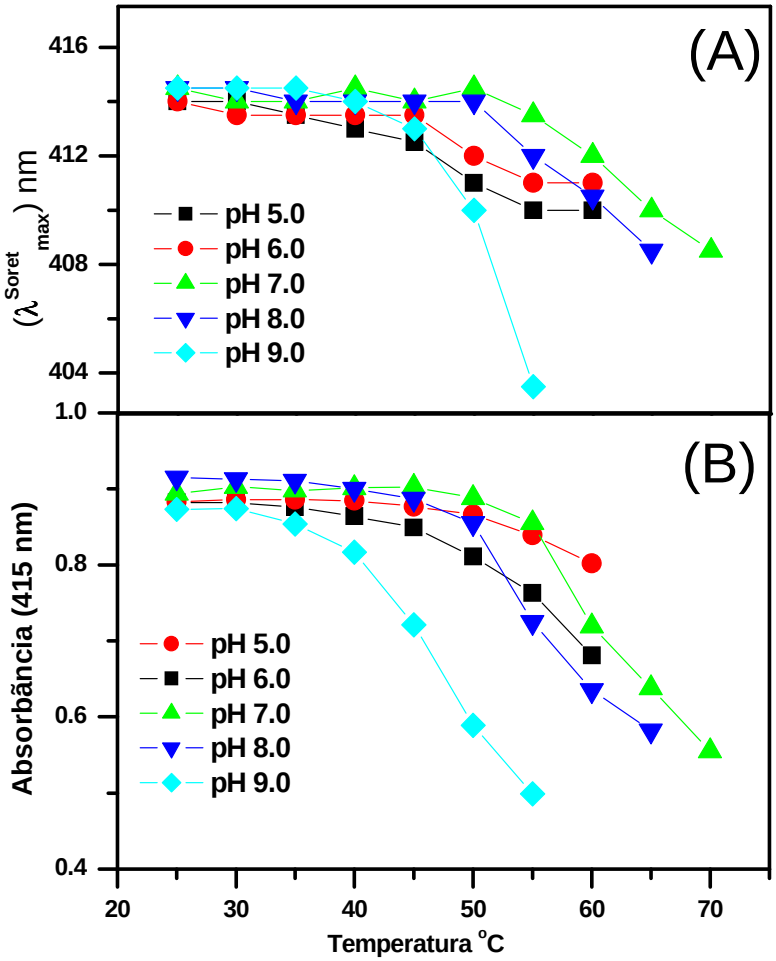


Figura 33: Deslocamento do λ^{Soret}_{max} e absorbância da banda de Soret da oxi-HbGp concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de 25- 70 °C, com variação de pH de 5,0 a 9,0. (A) λ^{Soret}_{max} e (B) absorbância em 415 nm.

5.3.2 Cianometa-HbGp

Os espectros de absorção óptica da cianometa-HbGp no UV-VÍS mostra bandas características da forma nativa a 25 ^{o}C, sobretudo no pH 7,0, com uma banda centrada em 420 nm (banda de Soret) e outra banda bem alargada em 540 nm (banda Q, [65] ,Figura 34). Na Figura 34 são mostrados ainda os espectros no pH 5,0, 7,0, 8,0 e 9,0 em função do aumento de temperatura.

Os espectros no pH5,0 da cianometa-HbGp não apresentam mudanças significativas, e assim como a oxi-HbGp, ela forma agregados em temperaturas maiores que 65 ^{o}C (Figura 34A). A cianometa-HbGp apresenta comportamento similar a pH 6,0.

No pH 7,0 a cianometa-HbGp apresenta mudanças espectrais consideráveis como a diminuição de intensidade da banda de Soret e um ligeiro deslocamento do comprimento de ondas máximo para o azul e alargamento dessa banda em 60 ^{o}C. Essa mudança espectral abrupta sugere alterações na esfera de coordenação e no ambiente do ferro do grupo heme, como a competição pela densidade eletrônica do ferro pelas moléculas de água e a histidina com o ligante CN^{-}, que se encontra inicialmente a 25 ^{o}C ligado a sexta coordenação do ferro. Com isso, os resultados sugerem o delocamento do CN- dessa coordenação e a ocupação dessa coordenação pelas moléculas de solvente formando aquometa-HbGp [59]. Ainda no pH 7,0, em 60 ^{o}C há também o surgimento de uma banda em 625 nm que se torna cada vez mais intensa com o aumento de temperatura, e que pode ser vista melhor na Figura 35B. Essa banda em 625 nm é característica da aquometa-HbGp [65,66].

Os espectros no pH 8,0 (Figura 34C) seguem comportamento semelhante aos do pH 7,0, no entanto, o deslocamento e alargamento da banda de Soret ocorrem de forma progressiva, sugerindo que a ocorrência de dissociação oligomérica da cianometa-HbGp acompanhada pela formação da aquometa-HbGp, como pode ser melhor visualizada na Figura 35C.

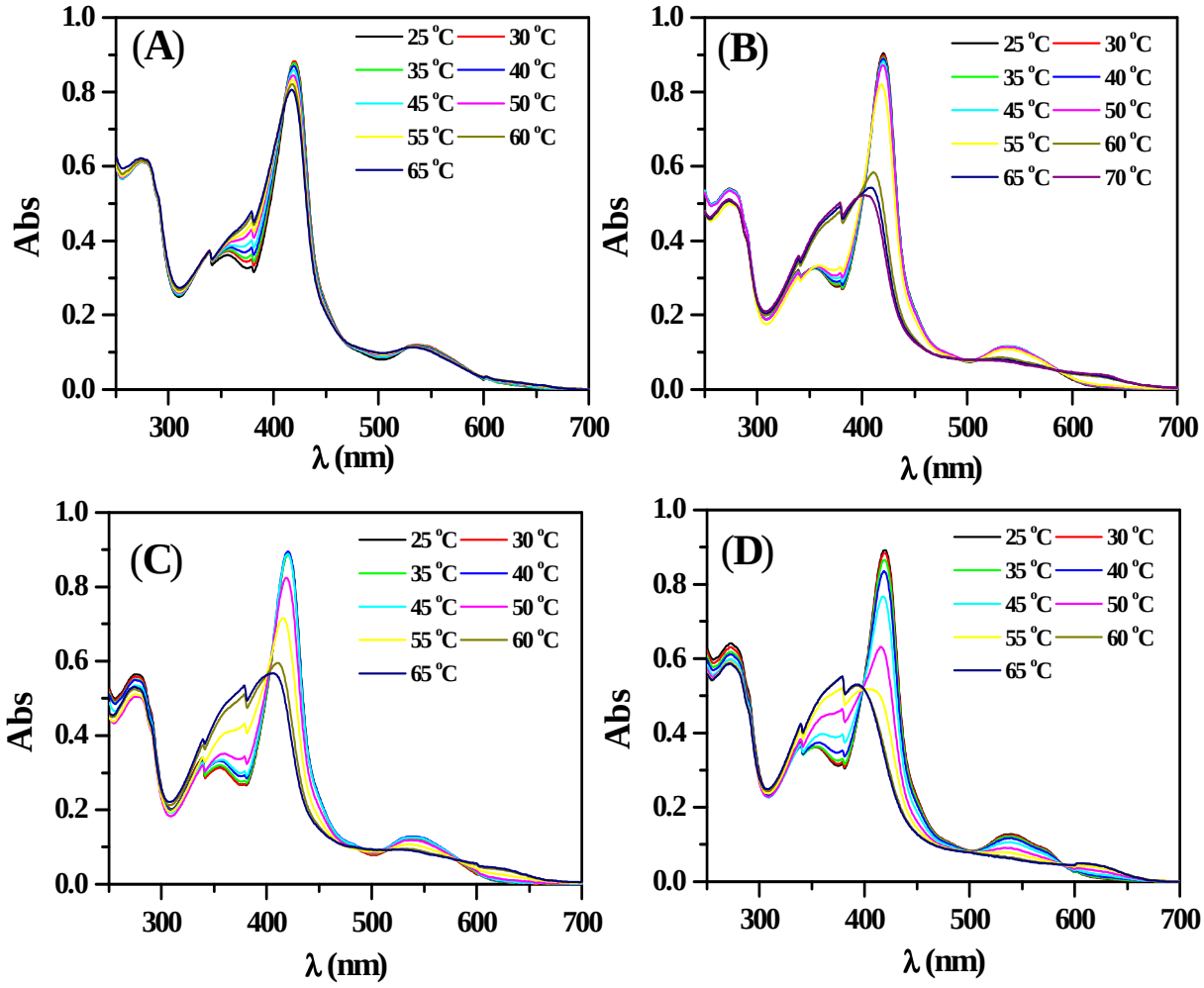


Figura 34: Espectros de absorção óptica no ultravioleta-visível da cianometa-HbGp na concentração 0,3 mg/mL, na faixa de temperatura 25 -70 °C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH 9,0.

No pH 9,0 as mudanças espectrais sugerem que nas temperaturas iniciais há no meio hemicromo com uma banda em 575 nm, e com o aumento de temperatura, ocorre a formação de espécies aquometa e pentacoordenadas, a partir de 60 ^{o}C com a banda de Soret larga (Figura 34D) e outra banda em torno de 600 nm (Figura 35D, [60]).

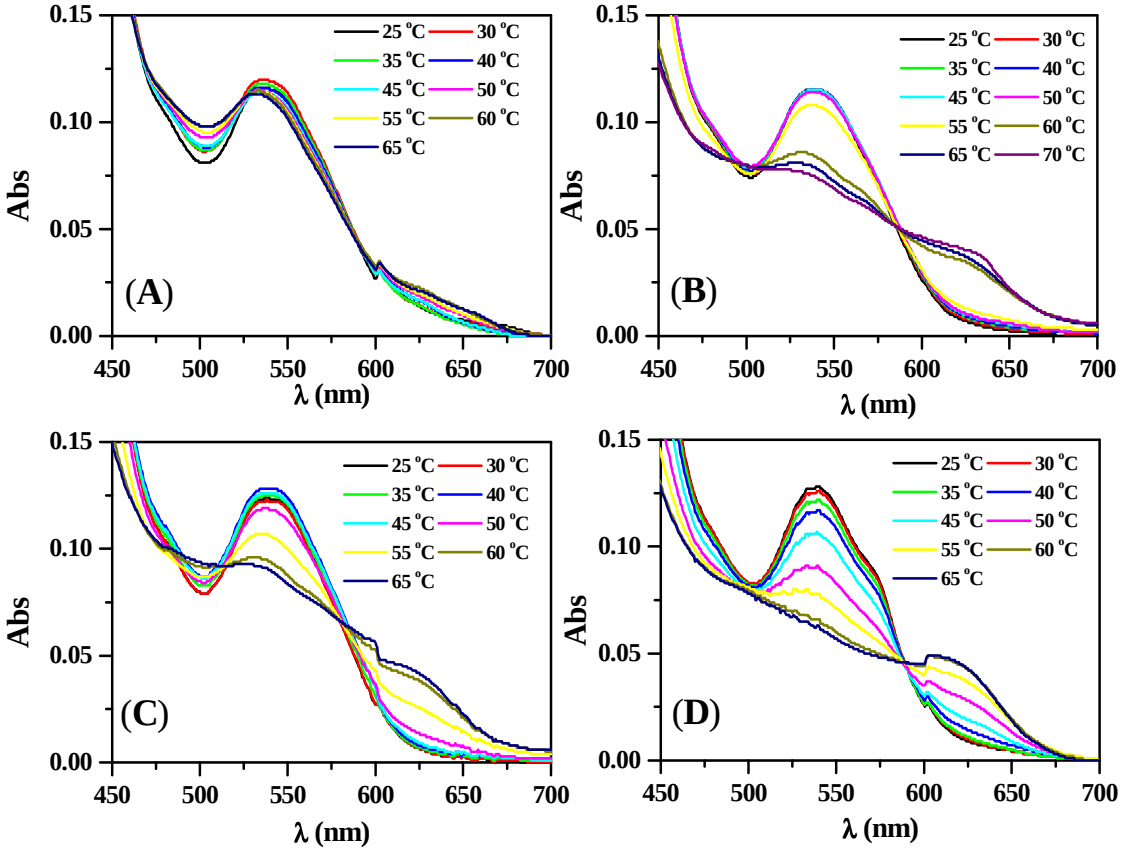


Figura 35: Espectros de absorção óptica das bandas Q da cianometa-HbGp, na concentração 0,3 mg/mL, na faixa de temperatura 25 -70°C. (A) pH5,0, (B) pH7,0, (C)pH 8,0 e (D)pH9,0.

A Figura 36 mostra o deslocamento do λ^{Soret}_{max} da banda de Soret da cianometa-HbGp e da absorbância em 420 nm, em função do aumento de

temperatura, nos vários pHs estudados. Esses dados mostram que no meio ácido a cianometa-HbGp realmente se mantêm estável mantendo-se integra até se agregar [54].

No pH 7,0 o λ^{Soret}_{max} se desloca consideravelmente a partir de 55 ^{o}C e absorbância em 420 nm também diminui a partir de 55 ^{o}C apresentando a 70 ^{o}C λ^{Soret}_{max} igual a 403 nm, sugerindo que na temperatura final a espécie predominante no meio é aquometa-HbGp e, possivelmente, uma pequena fração de espécies pentacoordenadas [63,64].

No pH 8,0 e 9,0 a cianometa-HbGp apresenta λ^{Soret}_{max} condizentes com a presença de aquometa, hemicromo e espécies pentacoordenadas, sendo que o hemicromo possui λ^{Soret}_{max} em torno de 413 nm e a espécie pentacoordenada possui λ^{Soret}_{max} entre 390 e 400 nm, e uma menor absorvitividade em 420 nm **, (**Figura 36). Essa mudança drástica do λ^{Soret}_{max} no pH 9,0 sugere a perda total do ligante CN^- pela a cianometa-HbGp facilitado pela dissociação oligomérica induzida pela temperatura. Devido às subunidades (trímero e monômero) serem mais susceptíveis a mudanças na esfera de coordenação do ferro e nesse caso, o ligante CN^- seria deslocado da sexta coordenação do ferro mais facilmente, resultando na formação de espécies aquometa e pentacoordenadas. No entanto, é importante acrescentar, que o CN^- é um ligante forte e conseqüentemente difícil de ser removido da coordenação do ferro, com isso, é difícil afirmar com precisão, que tipo de mecanismo está envolvido no seu processo de deslocamento da coordenação do ferro. O que é bastante claro de nossos resultados é o fato de que a cianometa-HbGp é bastante estável em função da temperatura permanecendo praticamente

inalterada até 55 °C. A estabilidade térmica da cianometa-HbGp é, portanto, maior do que a da oxi-HbGp nas mesmas condições de concentração e pH.

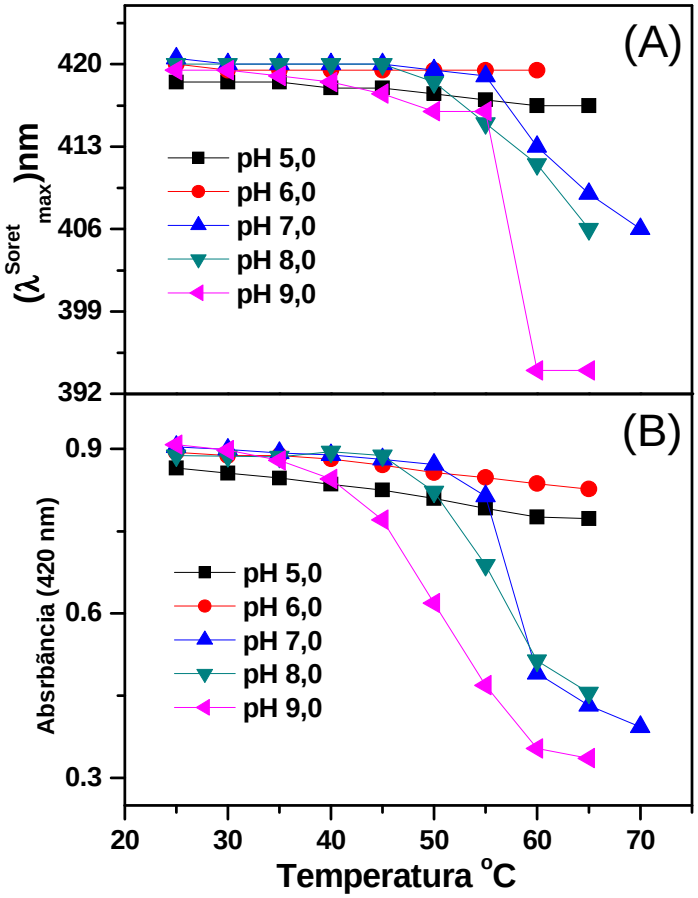


Figura 36: Deslocamento do λ^{Soret}_{max} e absorbância da banda de Soret da cianometa-HbGp concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de 25- 70 °C, com variação de pH de 5,0 a 9,0. (A) λ^{Soret}_{max} e (B) absorbância em 420 nm.

5.3.3 Meta-HbGp

Com a meta-HbGp inicialmente a 25 °C, no pH 7,0, observa-se um espectro característico da aquometa-HbGp íntegra apresentando comprimento de onda do máximo de absorção na banda de Soret de 405 nm, além da banda de transferência

de carga do ligante-metal em 625 nm e em 500 nm (bandas Q) que também é característica dessa espécie (Figura 37, [30]).. Na Figura 37 são mostrados também os espectros de absorção óptica no UV-VÍS no pH 6.0, 7,0, 8,0 e 9,0 com o aumento de temperatura.

A meta-HbGp, quando em solução de pH 5,0, se mostra bem estável não apresenta mudanças espectrais significativas nas temperaturas estudadas, e forma agregados a temperaturas maiores que 65 ^{o}C, como observado para oxi- e cianometa-HbGp [65].

No pH 7,0 a meta-HbGp (Figura 37B) se mantêm na forma aquometa até 45 ^{o}C mantendo os comprimentos de onda da banda de Soret, e da banda Q e de transferência de cargas ligante-metal em 625 nm, característica da forma nativa. Entretanto, a partir de 50 ^{o}C ocorre a formação de hemicromo com o deslocamento da banda de Soret para o vermelho em torno de 413 nm, que é característica da espécie hemicromo [64,66]. O hemicromo possui também bandas em 535 e 565 nm como pode ser observado na Figura 38B. Nas temperaturas maiores que 60 ^{o}C a quantidade de hemicromo no meio diminui pois a banda de Soret é deslocada novamente para comprimento de onda próximo a 405 nm e se torna menos intensa [60,67]. Esse deslocamento da banda de Soret de 413 nm, a 50 ^{o}C, para comprimentos próximos de 405 nm sugere que o hemicromo se desnatura parcialmente e forma a espécie pentacoordenada [60]. A espécie pentacoordenada com ombro em 600 nm também é caracterizada por uma banda de Soret mais larga e menos intensa do que da aquometa com ombro em 625 nm, e o hemicromo por ombros em comprimentos de onda 530 e 576 nm [67]. Esses ombros podem ser melhores visualizados na Figura 38B.

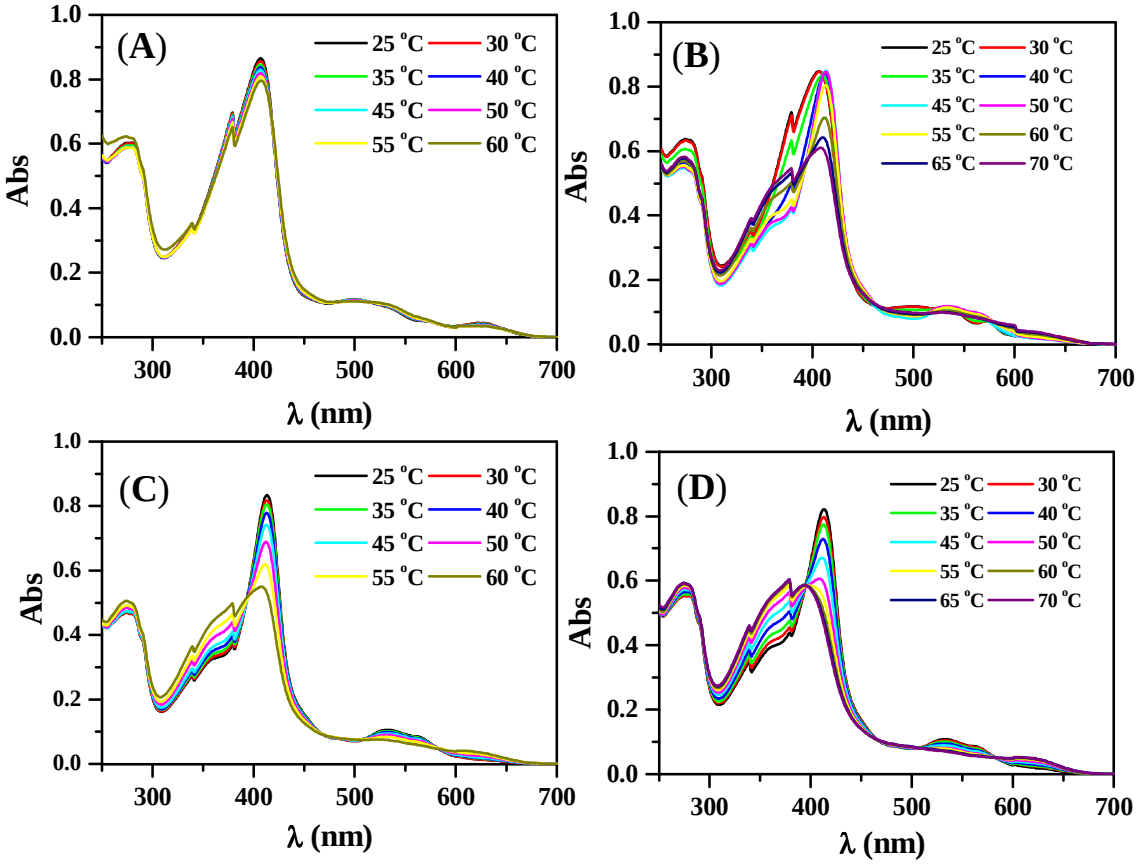


Figura 37: Espectros de absorção óptica no ultravioleta-visível da meta-HbGp na concentração 0,3 mg/mL, na faixa de temperatura 25-70 °C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH 9,0.

No meio alcalino (pH 8,0, Figura 37C) os espectros mostram a banda de Soret centrada em 413 nm a 25 °C, sugerindo que nessa condição de pH a espécie majoritária presente no meio é o hemicromo (59). Entretanto, à medida que a temperatura é aumentada há uma diminuição da quantidade de hemicromo, como visto, pelo alargamento e redução da banda de Soret de forma gradativa, acompanhada por deslocamento para próximo de 400 nm. Pode ser visto também que, a partir de 45 °C, surge uma banda em 625 nm, que se desloca para próximo de 600 nm com a elevação da temperatura (Figura 38C). Essa banda em 600 nm é atribuída a formação de espécies pentacoordenadas no meio [60, 67].

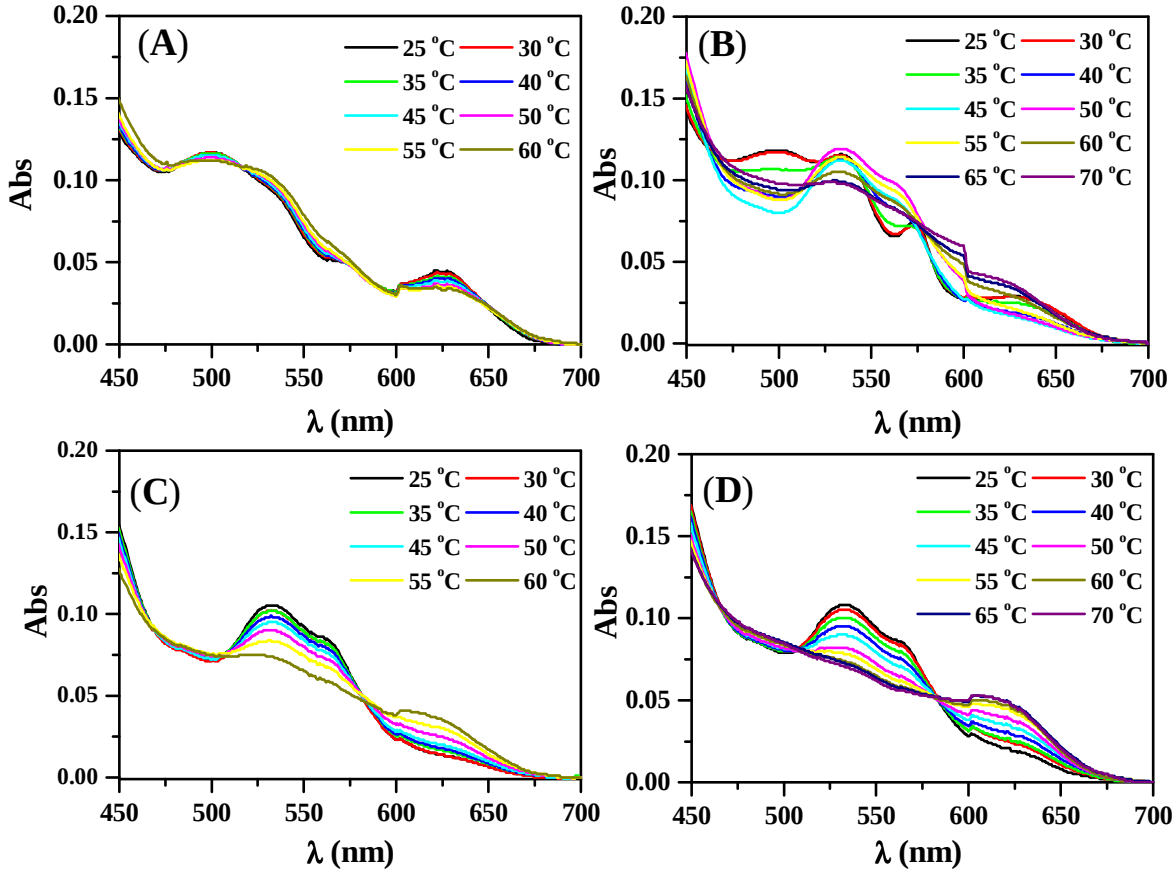


Figura 38: Espectros de absorção óptica das bandas Q da meta-HbGp, na concentração 0,3 mg/mL, na faixa de temperatura 25 -70 ^{o}C. (A) pH5,0, (B) pH7,0, (C) pH 8,0 e (D) pH9,0.

No pH 9,0 a 25 ^{o}C a meta-HbGp também se encontra na forma de hemicromo. No entanto, essa espécie é desnaturada parcialmente em temperatura menor e a banda referente a espécie pentacoordenada próxima a 600 nm é mais intensa sugerindo que é formada maior quantidade dessa espécie do que no pH 8,0. Essa menor estabilidade térmica no pH 9,0 é devido a meta-HbGp se encontrar totalmente dissociada a 25 ^{o}C o que facilita a formação de maior quantidade de hemicromo e espécie pentacoordenada [60-65].

Analisando o deslocamento do λ^{Soret}_{max} e a absorbância em 405 nm da meta-HbGp em função da temperatura nos vários pHs mostrados na Figura 39. Pode-se

observar que realmente a meta-HbGp se mantêm praticamente estável no pH 5,0 e 6,0, até a formação de agregados. No pH 7,0 observa-se que no intervalo de temperatura 45-55 ^{o}C a quantidade de hemicromo no meio atinge o máximo e depois reduz devido à desnaturação. No meio alcalino o hemicromo formado no meio é menos estável e no pH 9,0 no intervalo 55-70 ^{o}C a espécie predominante no meio é a pentacoordenada com λ^{Soret}_{max} centrada em 395 nm e a uma baixa absorção. A formação de hemicromo e espécies pentacoordenadas pela meta-HbGp, no processo desnaturação, tem sido descrita como sendo espécies comuns na desnaturação tanto por pH ácido como alcalino, tanto da meta-HbGp ìntegra como da subunidade monomérica *d* [60,64,65,67,68].

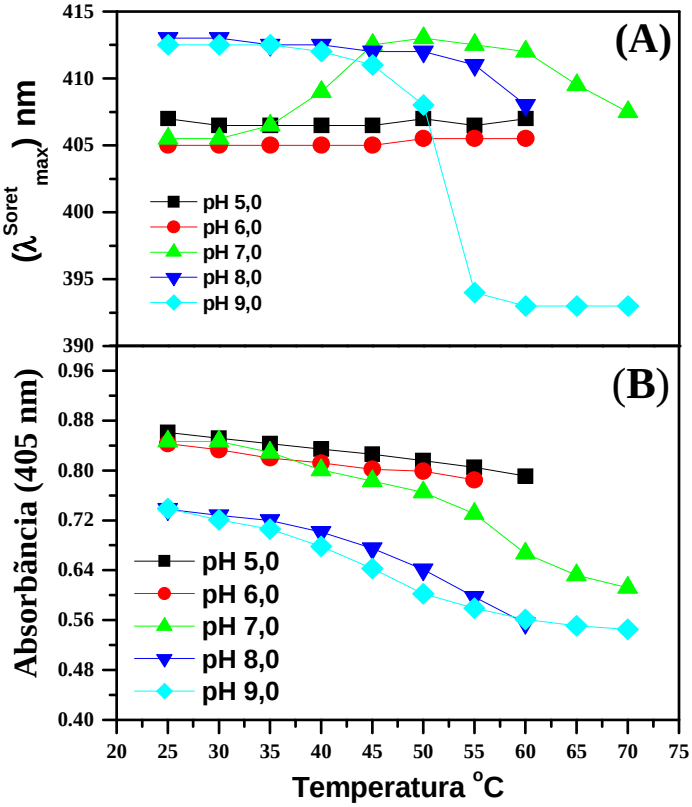


Figura 39: Deslocamento do λ^{Soret}_{max} e absorbância da banda de Soret da meta-HbGp concentração 0,3 mg/mL, no intervalo de 25- 70 °C, com variação de pH de 5,0 a 9,0. (A) λ^{Soret}_{max} e (B) absorbância em 405 nm.

5.3.4 Fração de desnaturação (Fu) e temperatura crítica (Tc) monitorando o centro ativo por absorção óptica da oxi-, meta- e cianometa-HbGp.

Com os dados de absorção em 415nm, 420 nm e 405 nm para oxi-, cianometa- e meta-HbGp, respectivamente, foi realizado o cálculo da fração de desnaturação em função da temperatura nos vários pHs estudados usando a equação 11. Nesse cálculo foi considerado que o processo de desnaturação do centro ativo da HbGp segue o modelo de dois estados [48]. Os gráficos da fração de desnaturação para as três formas de HbGp são mostrados na Figura 40. E os

valores de temperatura críticas obtidos a partir desses gráficos se encontram reunidos na Tabela 7.

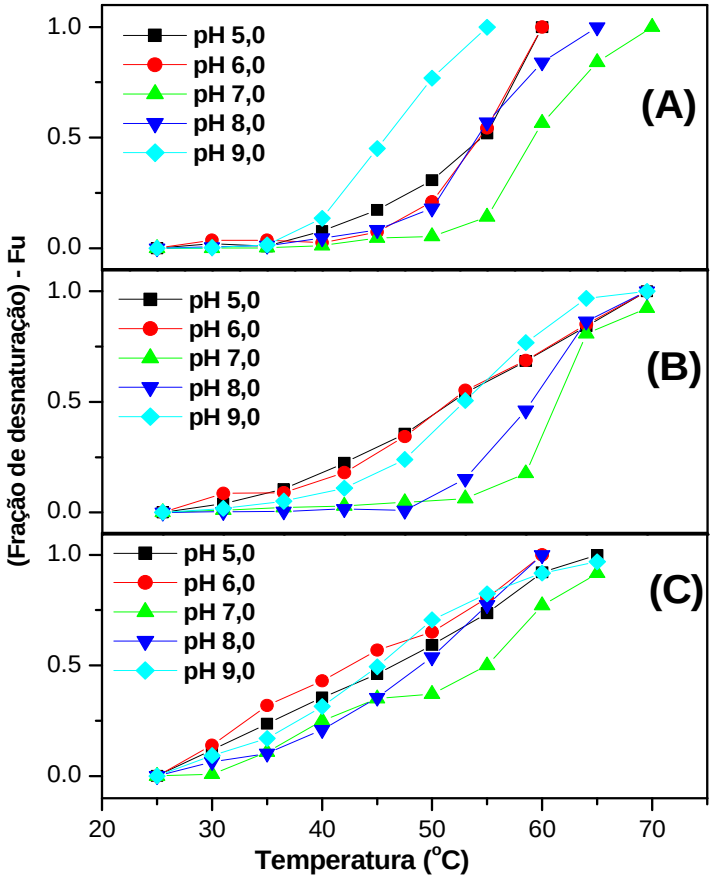


Figura 40: Fração de desnaturação da HbGp na faixa de pH 5,0 a 9,0 no intervalo de temperatura 25-70 °C, usando os valores da absorção na banda de Soret. (A) oxi-HbGp 415 nm, (B) cianometa-HbGp 420 nm e (C) meta-HbGp 405 nm.

Analisando a Tabela 7 observa-se que a ordem de estabilidade térmica do centro ativo seguida pela oxi-, meta- e cianometa- HbGp não é linear como observado no monitoramento da estrutura secundária por dicroísmo circular. No pH 5,0 e 6,0 a ordem de estabilidade é oxi-HbGp > cianometa-HbGp > meta-HbGp,

tendo a forma oxi um valor de Tc 6 ^{o}C maior do que a cianometa, e a meta e cianometa diferem em 2 ^{o}C. Essa diferença de Tc da oxi- e cianometa-HbGp é associada à maior tendência de agregação da cianometa, que é muito parecida com a meta-HbGp, como visto em trabalhos anteriores [29,54]. No pH 7,0 a oxi- e cianometa-HbGp possuem valores de Tc 3 ^{o}C maiores que o valor da meta –HbGp. Acredita-se que esses valores de Tc maiores estão intrinsecamente relacionados ao hemicromo formado pela oxi- e meta-HbGp no processo de desnaturação, tendo em vista, que o hemicromo é uma espécie bastante estável. No pH 9,0 a cianometa-HbGp possui maior valor de Tc do que oxi- e meta-HbGp indicando que a cianometa se dissocia menos com a temperatura, sendo mais difícil desnaturá-la.

Tabela 6: Temperatura critica (Tc) da oxi-,cianometa- e meta-HbGp no intervalo de pH 5,0 ao 9,0 em função da temperatura. Os valores de Fu foram calculado a partir dos valores de absorbância em 415 nm, 420 nm e 405 nm para oxi,cianometa- e meta-HbGp, respectivamente

pH	oxi-HbGp	cianometa-HbGp	meta-HbGp
5,0	54 ± 1	48 ± 1	45 ± 2
6,0	54 ± 1	48,5 ± 0,2	43 ± 1
7,0	58,5 ± 0,7	58 ± 1	54 ± 1
8,0	54,2 ± 0,1	54,3 ± 0,3	49,2 ± 0,2
9,0	46 ± 0,5	49,6 ± 0,2	44,6 ± 0,4

5.4 0 Estabilidade térmica da oxi-, cianometa- e meta-HbGp monitorado por DSC, CD e absorção Óptica.

Analisando os dados obtidos por DSC, CD e absorção óptica, observa-se que no pH ácido realmente a oxi-, meta- e cianometa-HbGp são mais estáveis e que o aumento de pH desestabiliza a HbGp possibilitando a formação de várias espécies parcialmente desnaturadas, resultando em diferentes graus de complexidade no processo de desnaturação seguido pelas diferentes formas de HbGp. As várias transições obtidas com os ajustes dos dados de DSC podem ser atribuídas à formação e desnaturação das espécies observadas nos resultados por absorção óptica e CD. O hemicromo presente no processo de desnaturação das três formas oxi, meta, e cianometa-HbGp se mostra bastante estável. Além do hemicromo, existem também espécies pentacoordenadas que também podem estar presentes no processo de desnaturação térmica, principalmente em meio alcalino. Acredita-se que a dissociação oligomérica da HbGp facilita a formação de espécies pentacoordenadas no meio com o aumento da temperatura aumentando a complexidade do mecanismo de desnaturação da HbGp.

No monitoramento da quantidade de estruturas em hélices-α não fica claro a influência da presença de espécies tais como hemicromo e espécies pentacoordenadas, e o quanto estas espécies contribuem na perda ou ganho de estrutura secundária e na resistência à desnaturação por temperatura. Com exceção da oxi-HbGp no pH 6,0 e 7,0 (Figura 26) que mostra um deslocamento forte na banda de Soret para o vermelho o qual foi atribuído à formação de hemicromo no meio, nas demais formas meta- e cianometa-HbGp não são observados fenômenos semelhantes. Entretanto, fica bem visível a contribuição da dissociação oligomérica

em meio alcalino na perda de estrutura secundária. A dissociação oligomérica torna a proteína menos rica em estruturas em hélices-α e menos resistente à desnaturação térmica

Outro fato que fica evidente è que a estabilidade da HbGp é fortemente influenciada pelo estado de oxidação do ferro do grupo heme e pela força do ligante coordenado à sexta coordenação do ferro. Dessa forma, o estado de oxidação do ferro influencia as propriedades físico-químicas da HbGp como mostram os resultados obtidos por DSC, CD e Absorção Óptica. As técnicas de DSC e CD mostraram que a cianometa-HbGp é mais estável e mais rica em estruturas secundárias. A técnica de absorção óptica mostrou que em meio ácido a cianometa- e a meta-HbGp se agrega em temperatura mais baixa do que a forma oxi, sugerindo que o estado de oxidação do ferro pode ser um fator importante na agregação.

Alguns estudos com proteínas pequenas, como no caso da mioglobina de baleia e de cavalo [69,70], mostram o efeito da presença de diferentes ligantes ligados ao ferro do heme dessas proteínas. Observa-se que a presença de ligantes fortes tais como o cianeto (CN-) e o monóxido de carbono (CO) torna essas proteínas muito mais resistentes à desnaturação por agentes caotrópicos (uréia, cloreto de guanidina) e por temperatura. Essa maior estabilidade da mioglobina de baleia e de cavalo na presença do CN^- é atribuída ao fato do CN^- ser um excelente aceitador de elétrons π, distorcendo assim a camada de valência do ferro. Essa distorção da camada de valência do ferro leva a modificações de cargas na superfície da globina, por mudanças conformacionais da estrutura globínica, e modificações de pontes salinas ou interações de dipolos na estrutura peptídica, modificando assim as cargas presentes na superfície da globina. No caso da HbGp

podemos afirmar que o cianeto exerce influência semelhante combinada com propriedades alostéricas comuns a essa classe de proteínas gigantes tornando, a cianometa-HbGp mais resistente à desnaturação por temperatura.

6.0 Conclusões

1) Pode-se inferir com base nos dados de DSC que as três formas oxi-, meta- e cianometa-HbGp são mais estáveis em meio ácido, e formam agregados grandes em altas temperaturas. Os termogramas possuem picos de transição endotérmica compostos por duas transições associadas à desnaturação do oligômero e à formação de agregados.

2) No pH neutro a cianometa- e meta-HbGp possuem termograma composto por duas transições, associadas à mudanças conformacionais e a desnaturação do oligômero, enquanto que em meio alcalino essas transições ficam mais evidentes.

3) A oxi-HbGp em meio alcalino possui termograma com dois picos de transição, um em temperatura menor composto por duas transições, e o outro em temperatura maior compostos por uma única transição. No pH 7,0 e 8,0 a cianometa-HbGp é cineticamente mais estável do que a oxi-HbGp e ambas possuem processo de desnaturação térmica cineticamente controlado.

4) Todas as transições da oxi-, meta- e cianometa-HbGp são bastante complexas e poucos cooperativas, possuindo alta probabilidade que essas transições representem a desnaturação de vários domínios da proteína e que cada domínio possua uma transição. Esses domínios devem ser bastante polares devido a razão $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ ser bem maior do que 1.

5) A cianometa-HbGp possui mais estrutura secundária mais estável do que a oxi- e a meta-HbGp. Entretanto, a oxi-HbGp no pH 6,0 e 7,0 forma hemicromo próximo a sua temperatura crítica, e nos demais valores de pH não é observada a

formação de qualquer outra espécie. A dissociação oligomérica em meio alcalino é maior na oxi-HbGp, do que, na forma cianometa-HbGp levando a diminuição da quantidade de estruturas secundárias e a redução da resistência a desnaturação térmica.

6) Com base nos estudos por absorção óptica pode-se inferir que os centros ativos da oxi-, meta- e cianometa-HbGp se mantêm praticamente estáveis até formarem agregados no meio ácido. Em pH neutro e alcalino o processo de desnaturação envolve a formação de hemicromo e espécies pentacoordenadas. Fica claro também que o pH do meio é um fator decisivo para a formação dessas espécies hemicromo e pentacoordenadas e no caso da cianometa-HbGp para a manutenção do CN^- ligado a sexta coordenação do ferro do heme. A taxa de auto-oxidação do ferro do heme da oxi-HbGp também é dependente do pH do meio.

Referências Bibliográficas

[1] STRYER, L. **Bioquímica.** New York: W. H. Freemam, 1995. cap. 3, p. 85-122.

[2] ROUSSELOT, M.; GUEN, D. Le.; CHABASSE, C.; ZAL, F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin. **FEBS Journal**, v. 273, n. 7, p.1582-1596, 2006.

[3] NELSON, D. L.; COX,M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**.Tradução de A. A. Simões e W.R.N. Lodi. New York: Almed, 2006. cap 6, p.159-188.

[4] KREBS, A.; ZIPPER, P.; VINOGRADOV, S. N. Lack of size and shape alteration of oxygenated and deoxygenated Lumbricus terrestris hemoglobin?. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1297, n. 2, p. 115 -118, 1996.

[5] EATON, W.; HOFRICHTER, J. Specific spectroscopic properties of hemoglobins. In: COLOWICH, S. P., E.; KAPLAN, N. O. (Ed.) **Methods in enzymology**. New York: Academic press. 1983. v 76, p. 175-262.

[6] KUCHUMOV, A. R.; TAVEAU, J. C.; LAMY, J. N.; WALL, J. S.; WEBER, R. E.; VINOGRADOV, S. N. The role of linkers in the reassembly of the 3.6 MDa hexagonal bilayer hemoglobin from *Lumbricus terrestris*. **Journal of Molecular Biology**. v. 289, n. 5, p. 1361-1374, 1999.

[7] VINOGRADOV, S. N. The stoichiometry of the four linker subunits of *Lumbricus terrestris* hemoglobin suggests an asymmetric distribution. **Micron,** v. 35, n. 1-2, p. 127-129, 2004.

[8] CARVALHO, F. A. O., SANTIAGO, P. S., BORGES, J. C., TABAK, M. On the molecular mass of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: analytical ultracentrifugation reexamination. **Analytical Biochemistry,** v. 385, n. 2, p. 257–263, 2009.

[9] ROYER, W.E.; KNAPP, J.E.; STRAND, K.; HEASLET, H.A. Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. **Trends in Biochemical Sciences***,* v. 26, n. 5, p. 297-304, 2001.

[10] ROYER, W.E.; SHARMA, H.; STRAND, K.; KNAPP, J.E. *Lumbricus* erythrocruorin at 3.5 angstrom resolution: Architecture of a megadalton respiratory complex. **Structure,** v. 14, n. 7, p. 1167-1177, 2006.

[11] ROYER, W.E.; STRAND, K.; VAN HEEL, M.; HENDRICKSON, W.A. Structural hierarchy in erythrocruorin, the giant respiratory assemblage of annelids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***,* v. 97, n. 13, p. 7107-7111, 2000.

[12] MEIRELLES, N.C.; OLIVEIRA, B.; OLIVEIRA, A.R.; DE PAULA, E.; MARANGONI, S.; RENNEBECK, G.M. Erythrocruorin of *Glossoscolex-Paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) - Dissociation at alkaline pH and its ligand properties as revealed by chemical, immunochemical and electron-microscopy studies. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology,** v. 88, n. 2, p. 377-379, 1987.

[13] AGUSTINHO, S. C. M.; TINTO, M. H.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M.; IMASATO, H. Fluorescence Studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in met form obtained from sephadex gel filtration. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 118A, n. 1, p. 171-181, 1998.

[14] AGUSTINHO, S. C. M.; TINTO, M. H.; IMASATO, H.; TOMINAGA, T. T.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. Spectroscopic studies of the met form of the extracellular hemoglobin from *Glossoscolex paulistus***. Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1298, n. 2, p. 148-158, 1996.

[15] IMASATO, H.; TINTO, M. H.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* obtained by gel filtration. **Comparative Biochemistry and Phyosiology B-Biochemistry e Molecular Biology**, v. 112, n. 2, p. 217-226, 1995.

[16] ROUSSELOT, M.; GUEN, D.; CHABASSE, C.; ZAL, F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular hemoglobin. **Febs Journal**, v. 273, n. 7, p. 1582–1596, 2006.

[17] FUSHITANI, K.; RIGGS, A.F. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus-Terrestris* - oxygenation properties of isolated chains, trimer, and a reassociated product*.* **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 16, p. 10275-10281, 1991.

[18] POLI, A.L.; MOREIRA, L.M.; TABAK, M.; IMASATO, H. SDS (sodium dodecyl sulfate) effect on the autoxidation of the *Glossoscolex paulistus* giant extracellular hemoglobin: Kinetic studies at pH 7.0 and 9.0. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces***,* v. 52, n. 1, p. 96-104, 2006.

[19] PETTA, V.; MORADIAN-OLDAK, J.; YANNOPOULOS, S.N.; BOUROPOULOS, N. Dynamic light scattering study of an amelogenin gel-like matrix in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, v. 114, p. 308-314, 2006.

[20] ZHU, H; OWNBY, D.W.; RIGGS, C.K.; NOLASCO, N.J.; STOOPS, J.K.; RIGGS, A.F. Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris* - roles of subunit equilibrai, non-globin linker chains, and valence of the heme iron. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 30007-30021, 1996.

[21] BRAMANTI, E.; ALLEGRINI, C.; ONOR, M.; RASPI, G.; SKOGERBOE, K.J.; SYNOVEC, R.E. Flow injection analysis with diode array absorbance detection and dynamic surface tension detection for studying denaturation and surface activity of globular proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 351, n. 1, p.100 - 113, 2006.

[22] RIGGS, A.F. Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1073-1084, 1998.

[23] KREBS, A.; KUCHUMOV, A.R.; SHARMA, P.K.; BRASWELL, E.H.; ZIPPERT, P.; WEBER, R.E.; CHOTTARD, G.; VINOGRADOV, S. N. Molecular shape, dissociation, and oxygen binding of the dodecamer subunit of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 31, p. 18695-18704, 1996.

[24] HARDING, S. E.; CHOWDHRY, B. Z. **Protein-ligand Interactions**: hydrodynamics and calorimetry. New York: Oxford, 2000. p. 826.

[25] FREIRE, E.; MURPHY, K. P.; SANCHEZ-RUIZ, J. M.; GALISTEO, M. L.S.; PRIVALOV, P. L. The molecular casis of cooperativity in protein folding. thermodynamic dissection of interdomain interactions in phosphoglycerate kinase. **Biochemistry**, v. 31, p. 250-256, 1992.

[26] CHAIRES, J. B. Calorimetry and thermodynamics in drug desing**. Annual Review of Biophysics**; v. 37, p. 135-151, 2008.

[27] BISPO, J.A.C.; LANDINI, G.F.; SANTOS, J.L.R.; NORBERTO, D.R.; BONAFE, C.F.S. Tendency for oxidation of annelid hemoglobin at alkaline pH and dissociated states probed by redox titration*.* **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology,** v.141, n. 4, p.498–504, 2005.

[28] BISPO, J.A.C.; SANTOS, J.L.R.; LANDINI, G.F.; GONÇALVES, J.M; BONAFE, C.F.S. PH dependence of the dissociation of multimeric hemoglobin probed by high hydrostatic pressure. **Biophysical Chemistry**, v.125, n. 2-3, p. 341-349, 2007.

[29] SANTIAGO, P.S.; MOURA, F.; MOREIRA, L.M.; DOMINGUES, M.M.; SANTOS, N.C.; TABAK, M. Dynamic light scattering and optical absorption spectroscopy study of pH and temperature stabilities of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 6, p. 2228–2240, 2008.

[30] TINTO, Maria Helena. **Caracterização das subunidades da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus***. 1994. 84f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1994.

[31] SANCHEZ-RUIZ, J. M. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. **Biophysical Journal**. v. 61, p. 921-935, 1992.

[32] GRINBERG, V. Y.; BUROVA, T. V.; HAERTLE, T.; TOLSTOGUZOV. V. B.; Interpretation of DSC data on protein denaturation complicated by kinetic and irreversible effects. **Journal of Biotechnology**, v. 79 n. 3, p. 269-280, 2000.

[33] IDAKIEVA, K.;PARVANOVA, K.; TODINOVA, S. Differential scanning calorimetry of the irreversible denaturation of *Rapana thomasiana* (marine snail, Gastropod) hemocyanin. **Biochimica et Biophysica Acta,** v.1748, n.1, p.50-56, 2005.

[34] PRIVALOV, P. L.; DRAGAN, A. I. Microcalorimetry of biological macromolecules. **Biophysical Chemistry,** v. 126, n. 1-3, p. 16–24, 2007.

[35] IDAKIEVA, K.; GIELENSB, C.; SIDDIQUIB, N. I.; DOUMANOVAC, L. VASSEVAA, B.; KOSTOVD, G.; SHNYROVE, V. L. Z. Irreversible thermal denaturation of beta-hemocyanin of helix pomatia and its substructures studied by differential scanning calorimetry. **Zeitschrift fur Naturforschung Section-a Journal of Physical Sciences**, v. 62a, p. 499 - 506, 2007.

[36] WEIJERS, M.; BARNEVELD, P. A.; STUART, M. A. C.; VISSCHERS, R. W. Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. **Protein Science**, v. 12, n.12, p. 2693-2703, 2003.

[37] BAO, L.; CHATTERJEE, S.; LOHMER, S.; SCHOMBURG, D.; An irreversible and kinetically controlled process: thermal induced denaturation of L-2-Hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus confuses*. **The Protein Journal,** v. 26, n.3, p. 143-153, 2007.

[38] ARROYO-REYNA, A.; TELLO-SOL, S. R.;ROJO-DOMINGUEZ, A.; Stability parameters for one-step mechanism of irreversibleprotein denaturation: a method based on nonlinear regression of calorimetric peaks with nonzero DCp. **Analytical Biochemistry**, v. 328, n. 2, p. 123 - 130, 2004.

[39] COOPER, A. Heat capacity effects in protein and ligand binding: a re-evalution of the role of water in biomolecular thermodynamics. **Biophysical Chemistry**, v. 115, n. 2-3, p. 89-97, 2005.

[40] LEHANE, S.; CHOWDHRY, B. Z. Thermodynamics background to differential scanning calorimetry. In: LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. (Ed.) **Biocalorimetry in the biological sciences**. New York: John Wiley, 1998. v 1, p.158-204.

[41] COOPER, A. Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. **Biophysical Chemistry,** v. 85, p. 25-39, 2000.

[42] FREIRE, E. Differential scanning calorimetry. SHIRLEY, B. A.(Ed.). **Protein stability and folding theory and practice**. Totowa: Humana Press, 1995. v. 40, p. 191-217.

[43] STIRPE A.; GUZZI, R.; WIJMA, H.; VERBEET, M. P.; CANTERS, G. W.; SPORTELLI, L. Calorimetric and spectroscopic investigations of the thermaldenaturation of wild type nitrite reductase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1752, n.1, p. 47-55, 2005.

[44] ANTONOV, Y. A.; WOLF, B. A. Calorimetric and structural investigation of the interaction between bovine serum albumin and high molecular weight dextran in water*.* **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 2980-2989*, 2005.*

[45] SANCHEZ-RUIZ, J. M. Protein kinetic stability. **Biophysical Chemistry,** v. 148, n. 1-3, p. 1-15, 2010.

[46] GERACI, G.; PARKHURST, L. Specific spectroscopic properties of hemoglobins. In: COLOWICH, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1983. v 76, p. 263-275.

[47] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN,T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 14, p. 300-316.

[48] DEMPSEY, C. E,; PIGGOT, T. J.; MANSON, P. E.; Dissecting contributions to the denaturant sentitivities of proteins. **Biochemistry***,* v. 44, p. 775-781, 2005.

[49] KHAN, F.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Chemical, Thermal and pH-induced Equilibrium Unfolding Studies of *Fusarium solani Lectin*. **IUBMB Life**, v. 59, n.1, p. 34-43, 2007

[50] VAN HOLD, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. **Principles of physical biochemistry**. New York :Prentice Hall, 1998. v. 1, cap. 10, p.419-448.

[51] KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biophysica et Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology,** v.1338, n. 2, p. 161-185, 1997.

[52] ARTMANN, G. M.; BURNS, L.; CANAVES, J. M.; TEMIZ-ARMANN, A.; SCHIMID-SCHONBEIN, G. W.; CHIEN, S.; MAGGKIS-KELEMEN,C. Circular dichroism spectra of human hemoglobin reveal a reversible structural transition at body temperature. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 33, n. 6, p. 490–496, 2004.

[53] FODOR, E.; FEDOSOVA, N. U.; FERENCZ, C.; MARSH, D.; POLI, T.; ESMANN, M. Stabilization of Na, K-ATPase by ionic intarations. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1778, n. 4, p. 835-843, 2008.

[54] SANTIAGO, S. P.; CARVALHO, F. C. O; DOMINGUES, M. M.; CARVALHO, J. W. P.; SANTO, N. C.; TABAK, M. Isoeletric point determination for *Glossoscolex paulistus* extracellular hemoglobin: oligomeric stability in acid pH and relevance to protein-surfactant enteraction. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9794–980, 2010.

[55] BITTAR, E.R.; CALDEIRA,F.R.; SANTOS,A.M.C.; GÜNTHER, A.R.; ROGANA, E.; SANTORO, M.M. Characterization of beta-trypsin at acid pH by differential scanning calorimetry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research***,* v. 36, n.12, p. 1621-1627, 2003.

[56] GAIKWAD, S.M.; KHAN, I. pH-dependent aggregation of oligomeric *Artocarpus hirsuta lectin* on thermal denaturation. **Biochemical and Biophysical Research Comunication,** v. 311, n. 2, p. 254-257, 2003.

[57] .KAUFMAN,,S. L.; KUCHUMOV, A. R.; KAZAKEVICH, M.; VINOGRADOV, S. N. Analysis of a 3.6-MDa hexagonal bilayer hemoglobin from *Lumbricus terrestris* using a gas-phase electrophoretic mobility molecular analyzer*.* **Analytical Biochemistry,** v. 259, n. 2, p. 195–202, 1998.

[58] IDAKIEVA, K,; NIKOLOV, P.; CHAKARSKA,I.; GENOV, N.; SHNYROV, V. L. Spectroscopic properties and conformational stability of *Concholepas concholepas* hemocyanin. **Journal of Fluorescence,** v. 189, n. 3-4, p. 715-725, 2008.

[59] RODRIGUEZ-LARREA, D.; MINNING, S.; BORCHERT, T. V.; SANCHEZ-RUIZ J. M., Role of solvation barriers in protein kinetic stability. **Journal Molecular Biology,** v. 360, n. 3, p. 715-724, 2006.

[60] RIBELATTO, J. C.; POLI, A. L.; MOREIRA, L. M. ; IMASATO. H. Estudo espectroscópico do equilíbrio entre espécies hexacoordenada dos monômeros d nativo e reconstituídos da hemoglobina extracelular gigante *Glossoscolex paulistus* em meio alcalino. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 666-673, 2006.

[61] BOFFI, A.; DAS, T. K.; LONGA, S. D.; SPAGNUOLO, C.; ROUSSEAU, D. L. Pentacoordinate hemin derivatives in sodium dodecyl sulfate micelles:model systems for the assignment of the fifth ligand in ferric heme proteins. **Biophysical Journal.** v. 77, n. 2, p. 1143–1149, 1999.

[62] DAS, T. K.; BOFF, A.; CHIANCONE, E.; ROUSSEAU, D. L. Hydroxide rather than histidine is coordinated to the heme in five-coordinate ferric scapharca inaequivalvis hemoglobin. **The Journal of Biologicall Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 2916–2919, 1998.

[63] TSURUGA, M.; MATSUOKA, A.; HACHIMORI, A.; SUGAWARA, Y.; SHIKAMA, K. The molecular mechanism of autoxidation for human oxyhemoglobin: tilting of the distal histidine causes nonequivalent oxidation in the β chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 15, p. 8607–8615, 1998.

[64] ROBINSON,V. L.; SMITH, B. B. ; ARNONE, A. A pH-dependent aquomet-to-hemichrome transition in crystalline Horse methemoglobin. **Biochemistry**, v. 42, n. 34, p. 10113-10125, 2003.

[65] RIBELATTO, J. C.; POLI, A. L.; MOREIRA,L.M. ; IMASATO. H. Hemes férricos pentacoordenados e hexacoordenados dos monômeros d nativo e reconstituído da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*: estudos espectroscópicos no meio ácido. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 829-833, 2005.

[66] POLI, A.L.; MOREIRA, L.M.; HIDALGO, A.A.; IMASATO,H. Autoxidation studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* at pH 9: cyanide and hydroxyl effect. **Biophysical Chemistry**. v. 114, n.2-3, p. 253-260, 2005.

[67] MOREIRA, Leonardo Marmo. **Espécies formadas no centro férrico da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* em função do pH: troca de ligante e desenovelamento polipeptídico.** 175f. Tese de (Doutorado) -Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

[68] MOREIRA, L. M.;POLI, A.L.; LYON, J. P.; AIMBIRE, F.; TOLEDO JÚNIOR, J. C.; COSTA-FILHO, A. J.; IMASATO, H. Ligand changes in ferric species of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* as function of pH: correlation between redox, spectroscopic and oligomeric properties and general implications with different hemoproteins. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines***,* v. 14, n. 1, p. 199-218, 2010.

[69] REGIS, W. C.B.; FATTORI, J.; SANTORO, M. M.; JAMIN, M.; RAMOS, C. H.I. On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 436, n. 1, p. 168–177, 2005.

[70] HARGROVE, M.S.; OLSON, J. The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity. **Biochemistry,** v. 35, n. 53, p. 11310-11318, 1996.

Apêndices

Apêndice A

Software origin versão 7.0lab

O software origin é bastante usado no tratamento de dados de microcalorimetria diferencial de varredura (DSC), que é uma técnica que vem sendo bastante usada no estudo de biomoléculas. E por acreditarmos que esse método de análise seja pouco difundido, nos propomos nessa seção elaborar um pequeno texto auto-explicativo sobre os métodos e procedimentos seguidos no tratamento dos dados obtidos com a HbGp, com o intuito de produzir uma descrição útil de alguns recursos oferecidos pelo software.

No tratamento dos dados de DSC foi usado o software origin 7.0lab, fornecido pela firma microcal junto com o aparelho microcalorimétrico, que possui a interface de entrada mostrada na Figura 41 onde podem ser vistos alguns comandos tais como: File, Edit, Graph, etc., na barra de ferramentas superior e na barra de ferramentas à esquerda comandos como: Read Data, Subtract Reference, etc., que serão usados ao longo dos procedimento de tratamento dos dados.

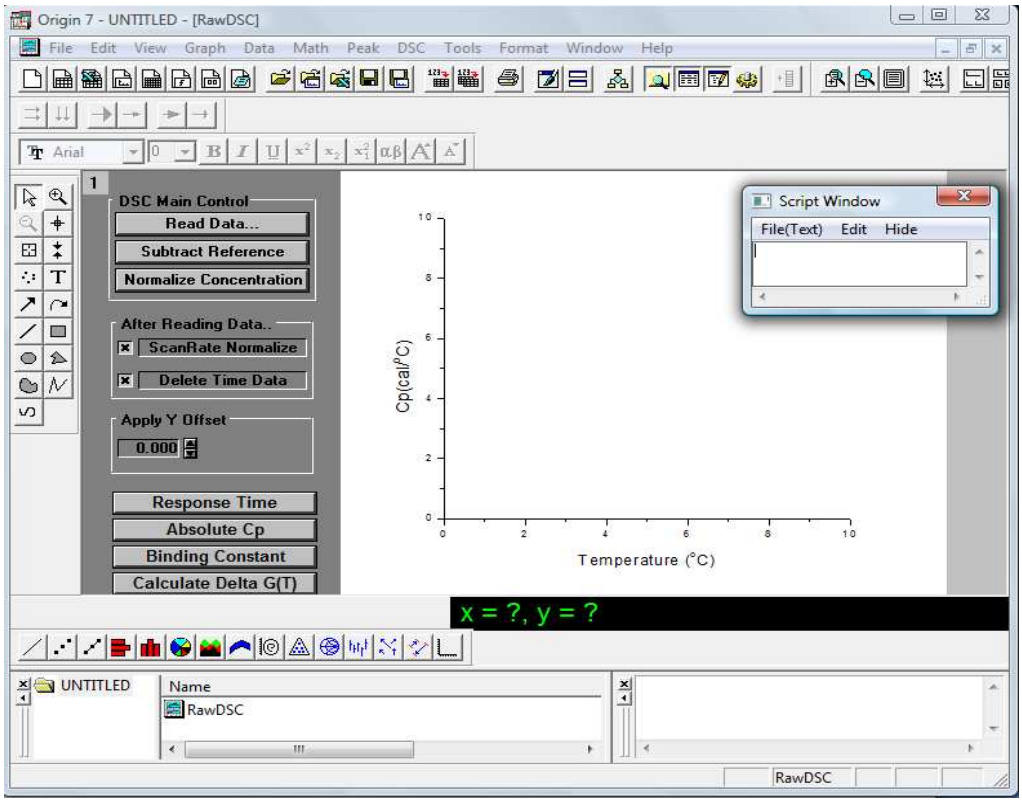


Figura 41: Janela de entrada do programa origin 7.0lab mostrando os ícones de comando (File, Edit, Graph, etc) na barra de ferramentas superior, e na barra à esquerda (Read Date, Subtract Reference, etc). .

O primeiro passo a ser feito no tratamento dos dados è a importação dos arquivos através do uso do comando READ DATA. Clicando uma vez, em seguida indica-se o caminho do arquivo. Quando o arquivo é encontrado selecione o arquivo e clique no comando ADD FILE(S) e OK. Podem ser selecionados vários arquivos e os mesmos aparecerão de acordo com a ordem de seleção. Pode-se também importar um arquivo de cada vez repetindo o procedimento descrito acima, várias vezes.

Depois de importado o arquivo, o segundo passo é a subtração da linha de base (tampão), do termograma da proteína. Para fazer a subtração usa-se o comando SUBTRACT REFERENCE e na janela menor deve-se selecionar a amostra em (DATA) e o tampão em REFERENCE e clicar OK, como mostrado na Figura 42.

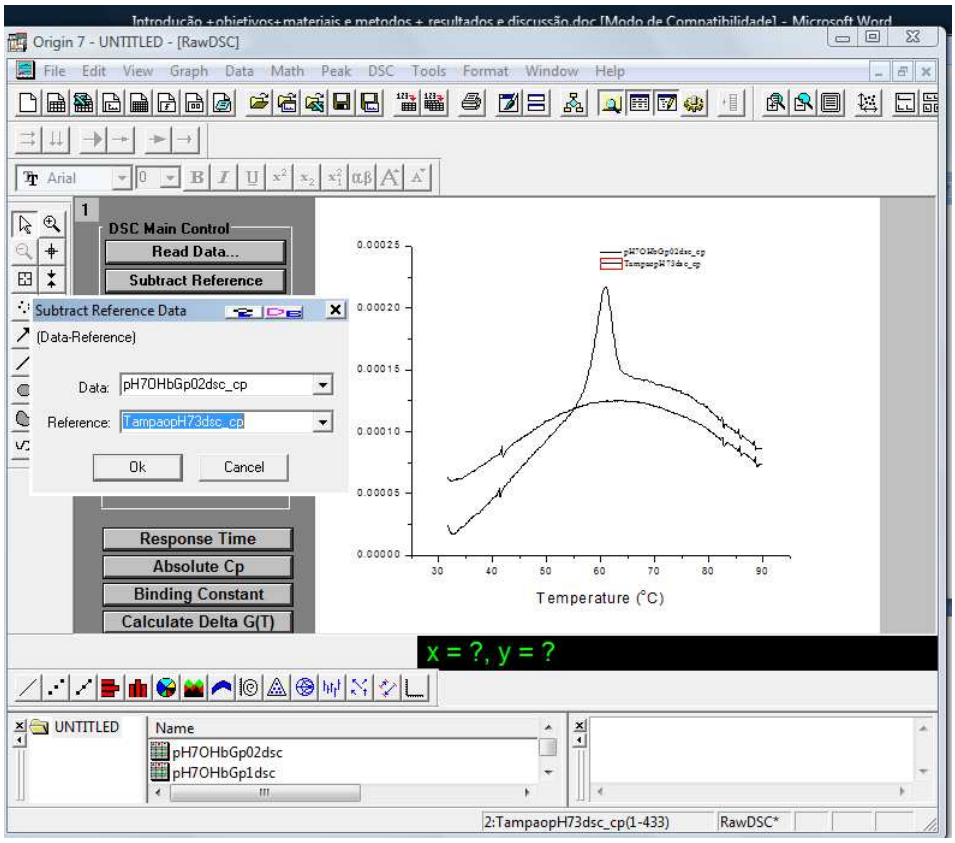


Figura 42: Subtraindo a linha de base (o tampão) do termograma da amostra. São mostrados os termograma da proteína e do tampão, e a esquerda a janela de seleção do termograma da amostra e do tampão para que sejam subtraídos.

Em seguida deve ser feita a normalização pela concentração do termograma da proteína, já subtraído o tampão e a unidade de concentração deve ser mmol/L. A

normalização é feita usando o comando NORMALISE CONCENTRATION digitando o valor da concentração e clicando OK.

O passo seguinte é acertar a linha de base, ou seja, trazer o inicio da curva do termograma para o valor de Cp = 0. Para fazer esse procedimento deve-se clicar no comando PEAK e depois em START BASELINE SESSION. Em seguida, na opção BASELINE – PROGRESS BASELINE clicar novamente na opção BASELINE e em MOVE BASELINE BY CURSOR para que a linha de correção seja ajustada usando o mouse, da forma desejada. Feito o acerto da posição da linha de correção, deve-se clicar OK e em seguida em SIM.

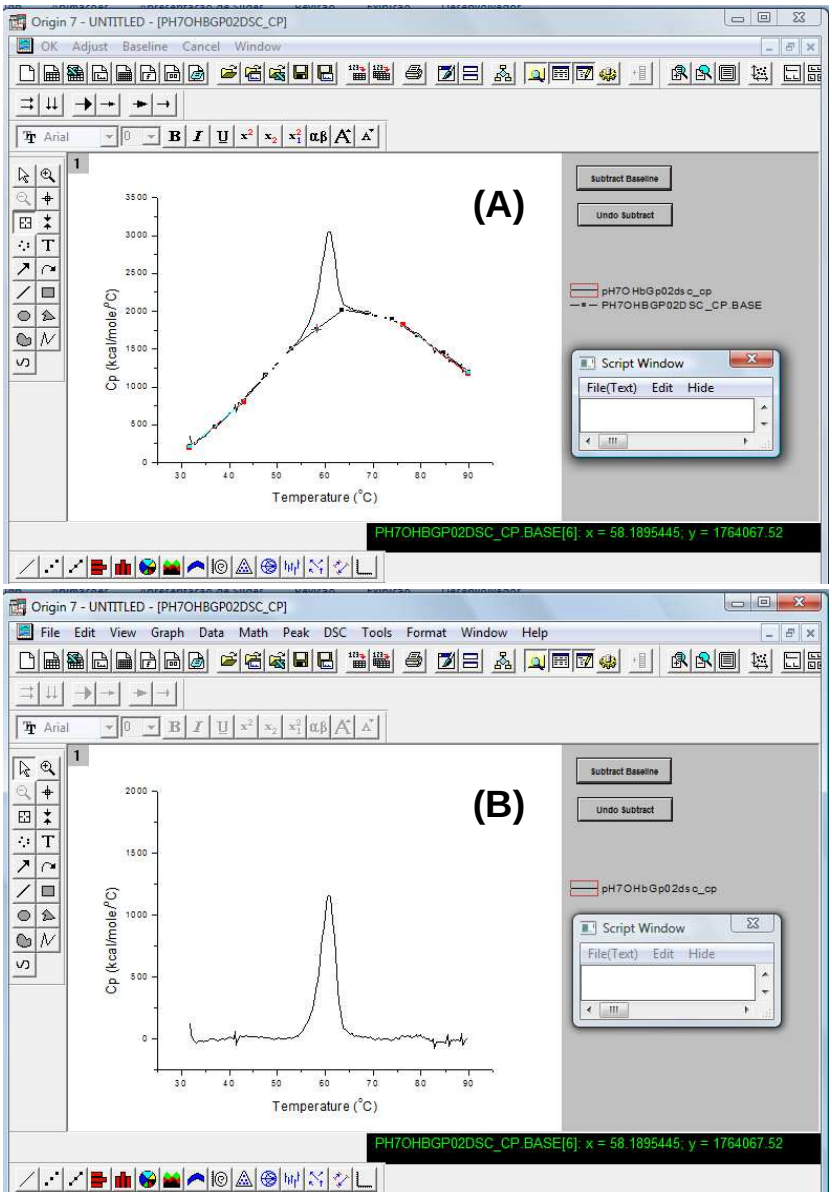


Figura 43: (A) A linha de correção da linha de base posicionada da forma desejada, (B) linha de base corrigida.

O próximo passo realizado é o ajuste não linear do termograma usando varieas transições no caso mostrado, o ajuste realizado com o termograma da oxi-HbGp pH 7,0 usando duas transições. Para escolher o ajuste deve-se clicar no comando DSC na barra de ferramenta superior e escolher o modelo NON-2-STATE clicar em CURSOR UNIT e irá abrir uma pequena janela onde deve ser digitado o

numero de transições que deseja ajustar o termograma e clique OK. Em seguida deverão ser marcados no termograma com o cursor do mouse os pontos correspondentes às transições que deseja ajustar. Esses pontos marcados no termograma servirão como guia para o software, no ajuste. Após indicados esses pontos, aparecerá uma janela igual a mostrada na Figura 45B. Nessa janela à esquerda (Figura 45B) se encontram os comandos para fazer as iterações onde pode ser feita 1 ou 100 iterações acionando o comando. Quando o software não está encontrando um ajuste para a curva experimental pode sugerir valores de Tm, ΔH_{cal},ΔH_{vH} ou fixar algum desses valores até que ele encontre um ajuste para a curva. No entanto, é recomendável no ajuste final que fiquem todos esses paramentos variáveis. Quando obtido um ajuste como o mostrado no gráfico da Figura 45B, clique na opção DONE. Será mostrado o ajuste encontrado para a curva experimental. Desse ajuste são obtidos os valores de Tm, ΔH_{cal} e ΔH_{vH} para cada transição do ajuste e cabe ao operador avaliar se as transições ajustadas são coerentes dentro da curva experimental.

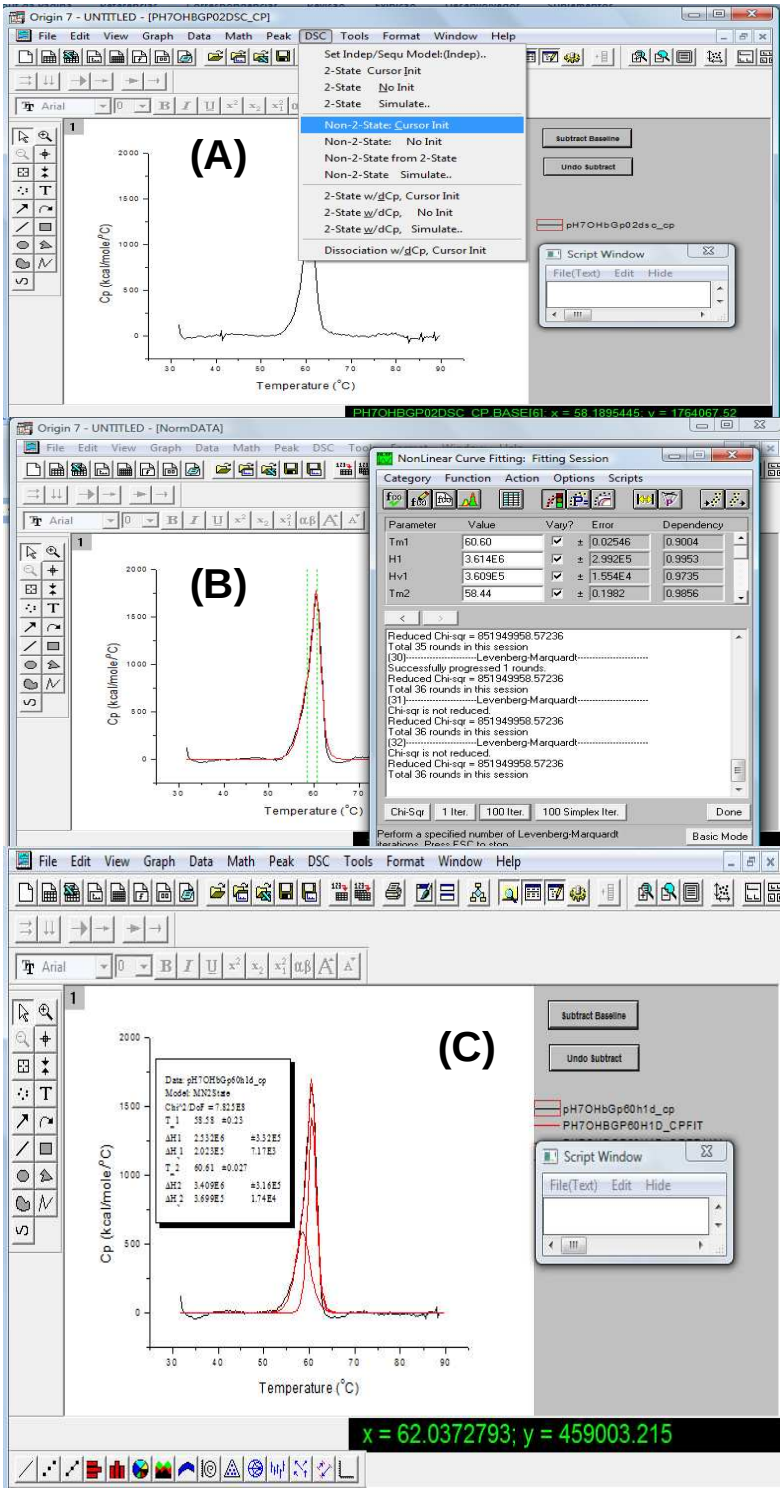


Figura 44: (A) Escolha do modelo de ajuste, (B) iterações do ajuste, e (C) o ajuste final.

Apêndice B

Software EspectraManager

O software Spectra Manager é um programa fornecido junto com o espectropolarìmetro da JASCO, que é usado para filtrar o ruído instrumental dos espectros de dicroísmo circular (CD) e transformar o formato do arquivo da extensão .jws, que é formato do arquivo obtido na medida, para o formato com a extensão .txt, que pode ser importado em outros softwares tais como o *Origin* da Microcal que é um dos mais usados na análise de dados experimentais.

Na Figura 45 é mostrada a interface de entrada do programa Spectra Manager onde podem ser observados vários ícones de comando tais como: File, Vew, Other e Help que permitem ao operador manusear o programa e tratar os dados experimentais.

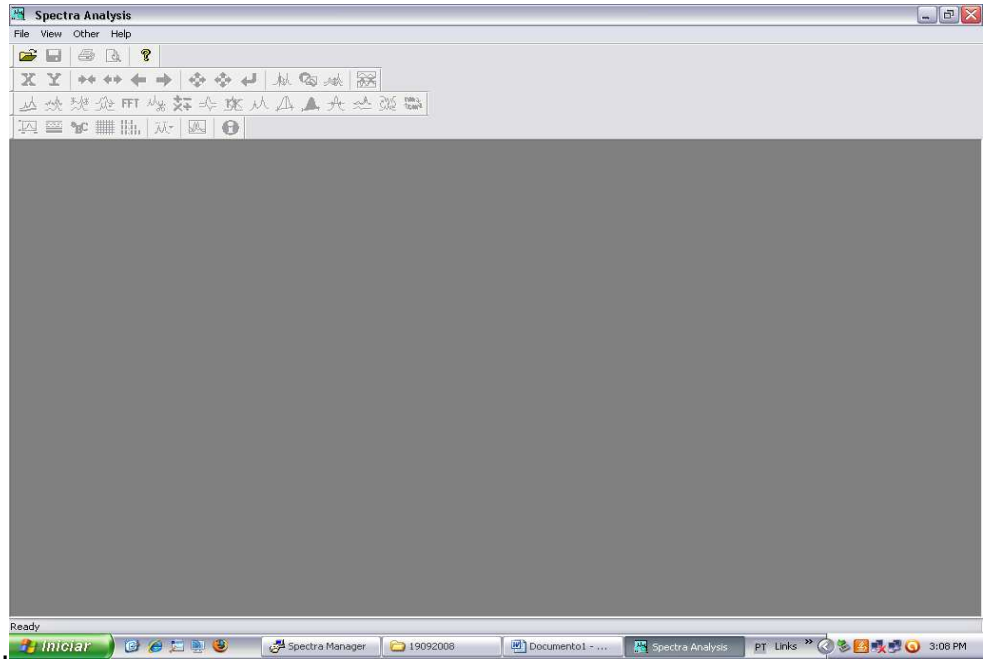


Figura 45: Interface do Software Spectra Manager mostrando os ícones File, Vew, Other e Help, entre outras ferramentas.

Na filtragem do espectro de dicroísmo circular o primeiro passo no é importar o arquivo de extensão jws através do comando FILLE – IMPORT –seleciona-se o arquivo e clica-se *OK.* Após ter importado o arquivo ele será mostrado como na Figura 46. Pode-se observar que a interface é mostrada em duas partes, sendo na parte superior o comando da filtragem, delimitado por uma linha azul, e na parte inferior da interface o espectro ruidoso que será filtrado, Figura 46A. A filtragem que corresponde ao segundo passo é realizada movendo o comando de filtro para a esquerda e observando se o espectro filtrado está ficando sobreposto ao espectro ruidoso, como mostrado na Figura 46B. Na filtragem o comando de filtragem deve ser movido lentamente para a esquerda, onde a parte superior marcada por um quadrado preto e a base marcada com o círculo aberto, (Figura 46A). Quando uma filtragem adequada é obtida como a mostrada na Figura 46B, deve-se clicar no comando OK. O espectro filtrado será mostrado e deve ser salvo com uma extensão

diferente da .jws, geralmente, aconselha-se que o arquivo do espectro filtrado seja salvo com a extensão .txt. O terceiro passo é salvar o espectro filtrado que pode ser feito usando o comando FILE e EXPORT e a extensão .TXT, e para finalizar aciona-se o comando OK e seu arquivo tratado já pode ser importado em outros softwares tais como, por exemplo, o Origin. Quando terminar a filtragem o espectro filtrado for salvo todas as janelas deverão ser fechadas, voltando para a interface mostrada na Figura 45 para que outro arquivo possa ser tratado, seguindo os mesmos passos descritos acima.

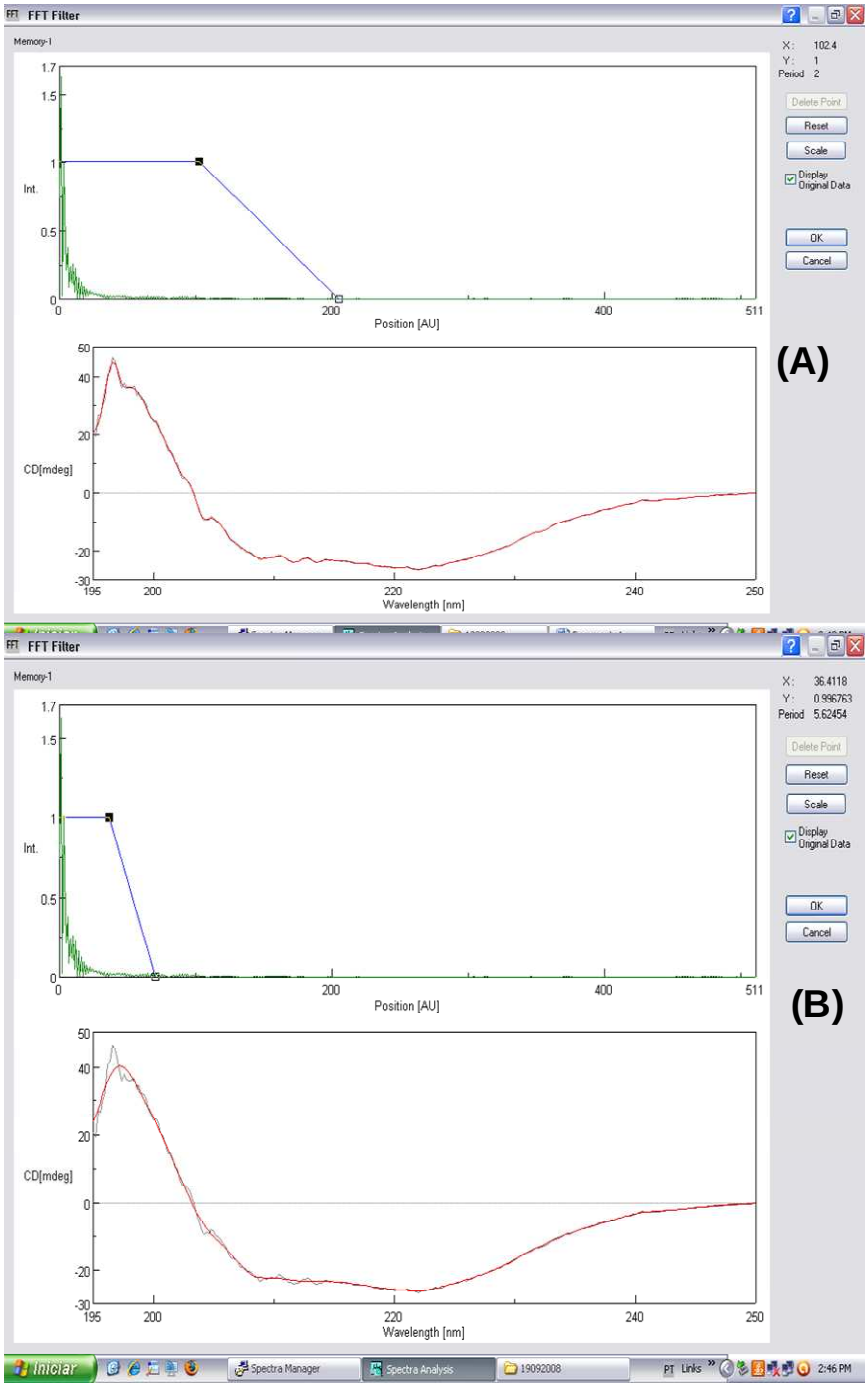


Figura 46: Interface do programa Spectra Manager na filtragem do espectro ruidoso de CD (A) Na parte superior da interface é mostrado o comando de filtro e na parte inferior o espectro ruidoso. (B) Na parte superior é mostrado o comando de filtragem movido para a esquerda e na parte inferior o espectro filtrado sobrepondo o espectro ruidoso. .

Na Figura 47 são mostrados espectros da oxi-HbGp na região das ligações peptídicas e do grupo heme e aminoácidos aromáticos nas formas filtrada e ruidosa. Pode ser observado que os espectros filtrados sobrepõem-se aos espectros ruidosos indicando que a filtragem foi bem sucedida. O ideal é que o espectro filtrado fique sempre sobreposto ao espectro ruidoso, o que pode ser observado na parte inferior da interface do Spectra Manager, que é mostrada na Figura 46. Para salvar a forma ruidosa é só observar que quando o espectro filtrado é salvo e todas as janelas vão sendo fechadas o software pergunta se deseja salvar. No caso de se desejar salvar o espectro ruidoso acione o sim e siga as dicas do terceiro passo.

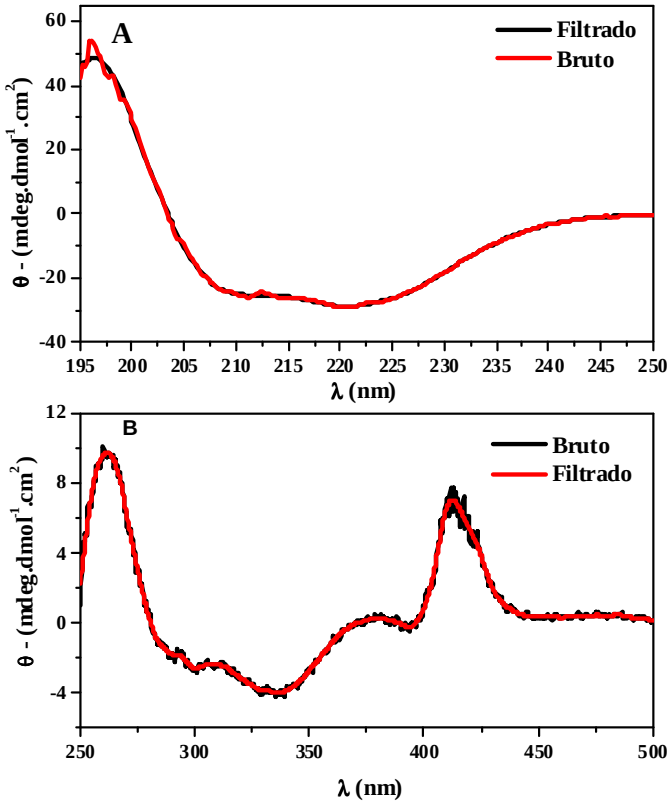


Figura 47: Espectros de CD da HbGp na região das ligações peptídicas (A), e na região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos.