UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**INTERAÇÃO DE PORFIRINAS HIDROFÍLICAS E DE HEMOGLOBINA
EXTRACELULAR COM MODELOS BIOMIMÉTICOS DE MEMBRANA BIOLÓGICA**

PATRÍCIA SOARES SANTIAGO

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, como requisito para
obtenção do título de Doutor em Ciências:
Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

São Carlos / SP

2008

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Roberto e Maria José, por terem alimentado os meus sonhos. Obrigado pelo carinho e cuidado, por mais distante que eu estivesse!

Às minhas irmãs, Priscila e Thaís, aos sobrinhos Octávio e Laura, pelos grandes momentos de alegria e amor!

Ao meu amado, Thiago, por me dar a felicidade necessária para concretizar essa tese

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Marcel Tabak, pela confiança, apoio e dedicação. Agradeço ao Sr. e a sua esposa, Magaly, pela convivência bastante carinhosa durante todos estes anos!

Ao Prof. Nuno C Santos, meu co-orientador em Portugal. Por aceitar-me para o estágio no exterior. Pelo carinhoso acolhimento e pela sua prestativa ajuda em todas as circunstâncias, principalmente durante a minha estadia em Lisboa.

A Profa. Rosângela Itri, por todas as discussões e ensinamentos. E é claro Rô, por todo o seu carinho e atenção durante todos estes anos. Sempre disposta a me ajudar e auxiliar!

Á Dra. Shirley C.M. Gandini, que me ensinou cada detalhe de como trabalhar no laboratório, analisar e discutir os dados. Serei eternamente grata ao seu apoio.

Ao Prof. Miguel Castanho pelas valiosas discussões nos experimentos de fluorescência com as porfirinas e nas análises dos dados de DLS, durante o meu estágio em Portugal.

A minha amiga Marilene, estivemos lado a lado, durante todos estes anos (mestrado e doutorado). Tivemos muitos momentos felizes, tristes, demos boas risadas, choramos, brigamos, nos divertimos, viajamos, congressos, dividimos os problemas, enfim, foi a minha grande companheira.

Ao Dr. Leonardo M. Moreira pela amizade, e por todas as discussões e elaborações dos nossos papers. Valeu irmão Sol!!!

Ao amigo Ézer, o técnico mais eficiente e atencioso!

Ao Leandro Barbosa, aluno de doutorado da Prof. Rosângela Itri. Quanta paciência você teve em me ensinar cada detalhe dos ajustes das curvas de SAXS. Foram horas de trabalho, e você tinha o dom de deixar estes momentos extremamente

agradáveis.

As alunas de iniciação científica, Érika e Franciane, muito obrigado pela grande ajuda nas medidas com a hemoglobina.

A Vanessa e a Claudia, essas secretárias são exemplos de eficiências. Quanta disposição em nos ajudar! Valeu meninas!

A todos os meus amigos do laboratório de Biofísica Molecular: Emerson, Wilker, Eduardo, Shirley, Alessandra, Angel, Claudia Bernal, Julio, Priscila, Renato, Aline, Marco, Rommel, Mari, Michele, Érika, Franciane, Diógenes, Leonardo, Janiciara, Ézer e Adriano (o recém chegado), e me desculpem se esqueci de colocar o nome de alguém!

A todos os meus amigos portugueses da Faculdade de Medicina e da Faculdade de Ciência. Quanta atenção, carinho, amizade obtive durante a minha estadia em Portugal. Um grande beijo à todos!

As minhas amigas da Biblioteca do IQSC.

À Andréia e a Silvia da pós-graduação, por toda a dedicação!

À TODOS os meus amigos !!!

À Janaina Garcia, que esteve sempre ao meu lado! Até lá fora heim Jana!!! Obrigado pela ajuda na formatação da tese!

À Priscila Menezes por todo o seu apoio, carinho e amizade!

Ao meu paciente Thiago, pela sua compreensão, e a sua grande ajuda na elaboração desta tese!

À minha família pelo apoio e por sua compreensão em várias ocasiões, quando não pude estar presente. Amo todos vocês!

À FAPESP pela bolsa concedida, e a CAPES pela bolsa de estágio no exterior.

E a DEUS, por TUDO.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS.....	XVIII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XXI
PARTE I.....	1
I.1. Introdução.....	1
I.1.1 Porfirinas.....	1
I.1.2. Modelos biomiméticos de Membranas Biológicas.....	5
I.1.2.1. Micelas.....	6
I.1.2.2. Micelas Mistas.....	7
I.1.2.3. Vesículas de Fosfolipídios.....	9
I.2. Objetivos.....	11
I.2.1 Objetivos específicos.....	11
I.3. Materiais e Métodos.....	12
I.3.1. Materiais.....	12
I.3.1.1. Preparação das amostras.....	12
I.3.1.1.1. Preparação das amostras de porfirinas com micelas de SDS e CTAC para as medidas de SAXS.....	12
I.3.1.1.2. Preparação das amostras de porfirina com micelas iônicas, zwitteriônicas, neutras e mistas.....	13

I.3.1.1.3. Preparação das vesículas (LUV- do inglês “Large Unilamellar Vesicles”) de fosfolipídeos a partir de palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG).....	14
I.3.1.1.4. Preparação das amostras de porfirina com vesículas de fosfolipídios	14
I.3.2. Métodos.....	15
I.3.2.1. Espalhamento de Raio-X a baixos ângulos (SAXS)	15
I.3.2.1.1. Métodos de análises dos resultados de SAXS	22
I.3.2.2 Espectroscopia de absorção ótica.....	26
I.3.2.3. Espectroscopia de fluorescência	27
I.3.2.4. Supressão de Fluorescência.....	29
I.3.2.5. Medidas de Fluorescência	30
I.3.2.6. Tempo de vida de fluorescência – Fluorometria no domínio da frequência	31
I.3.2.7. Espalhamento de luz Ressonante	33
I.3.2.7.1. Princípios básicos	34
Onde I_{EL}^{abs} é a intensidade de luz espalhada da solução que tem a absorbância A e I_{EL} é a intensidade de luz espalhada da solução com o mesmo espalhamento de luz mas sem absorção.	35
I.3.2.7.2. Medidas de Espalhamento de luz Ressonante	35
I.4. Resultados e Discussões.....	36
I.4.1. Interação das porfirinas aquo-solúveis TMPyP e TPPS ₄ e com micelas de SDS e CTAC investigada por espalhamento de Raio –X a baixo ângulo (SAXS).....	36
I.4.1.1. Interação da porfirina TPPS ₄ com micelas de CTAC.....	36
I.4.1.1.1. Micelas puras de CTAC	36
I.4.1.1.2. Efeito da porfirina TPPS ₄ nas micelas de CTAC.....	38
I.4.1.1.3. Estruturas das micelas de CTAC quando comparada com dados da literatura..	46
I.4.1.1.4. Discussão geral dos resultados da interação das micelas de CTAC na presença da porfirina TPPS ₄	52
I.4.1.2. Interação da porfirina TMPyP com micelas de SDS.....	53
I.4.1.2.1 Discussão geral dos resultados da interação das micelas de SDS na presença da porfirina TMPyP.....	56

<i>I.4.2. Estudos de supressão de fluorescência das porfirinas TMPyP e TPPS₄ em diferentes tipos micelas.</i>	58
<i>I.4.2.1. Supressão de fluorescência da TMPyP na ausência e na presença de micelas nas temperaturas de 25 e 50 °C.</i>	58
<i>I.4.2.2. Supressão de fluorescência da TPPS₄ na ausência e na presença de micelas nas temperaturas de 25 e 50 °C.</i>	64
<i>I.4.2.3. Discussão geral dos resultados de supressão de fluorescência da TMPyP e TPPS₄ na ausência e na presença de micelas.</i>	70
<i>I.4.3. Estudos espectroscópicos da interação das porfirinas TMPyP e TPPS₄ com micelas puras e micelas mistas.</i>	73
<i>I.4.3.1. Porfirina catiônica na presença de micelas puras de SDS e na presença de micelas mistas</i>	73
I.4.3.1.1. Efeito do surfactante neutro TX-100 no agregado pré-micelar TMPyP+SDS ..	73
I.4.3.1.2. Titulação da TMPyP em função da concentração da micela mista 80%SDS+20%TX-100 ..	77
I.4.3.1.3. Discussão geral da porfirina catiônica na presença de micelas puras de SDS e na presença de micelas mistas.	83
<i>I.4.3.2. Porfirina aniônica na presença de micelas puras de CTAC e na presença de micelas mistas</i>	84
I.4.3.2.1. Efeito do surfactante neutro TX-100 no agregado pré-micelar TPPS ₄ -CTAC ..	84
I.4.3.2.2. Titulação da TPPS ₄ em função da concentração da micela mista 60%CTAC + 40%TX-100.	93
I.4.3.2.3. Discussão geral da porfirina aniônica na presença de micelas puras de CTAC e na presença de micelas mistas.	100
<i>I.4.3. Interação de TMPyP com vesículas de fosfolipídeo: um estudo por fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo.</i>	101
<i>I.4.3.1. Interação entre a TMPyP com diferentes vesículas de fosfolipídios</i>	101
<i>I.4.3.2. Supressão de fluorescência da TMPyP na presença de vesículas de fosfolipídios</i>	108
<i>I.4.3.3. Discussão geral dos resultados de supressão de fluorescência da TMPyP na ausência e na presença de vesículas de fosfolípideos.</i>	113

<i>PARTE II</i>	116
II.1. Introdução	116
<i>II.1.1 Hemoglobina extracelular de Glossoscolex paulistus (HbGp)</i>	116
<i>I.1.1. Desnaturação de proteínas</i>	120
II.2 Objetivos	121
<i>II.2.1 Objetivos específicos</i>	121
II.3 Materiais e Métodos.....	122
<i>II.3.1 Materiais</i>	122
<i>II.3.1.1 Preparação das amostras de HbGp em função da concentração de diferentes surfactantes para as medidas espectroscópicas.</i>	122
<i>II.3.1.2 Preparação das amostras de HbGp em diferentes valores de pH para as medidas de DLS.</i>	123
<i>II.3.2 Métodos</i>	123
<i>II.3.2.1 Fluorescência</i>	123
<i>II.3.2.2 Dicroísmo Circular (CD)</i>	124
<i>II.3.2.3 Espalhamento de luz dinâmico</i>	124
II.4 Resultados e discussões	127
<i>II.4.1 Interação da HbGp com os surfactantes SDS, CTAC e HPS : dissociação da estrutura oligomérica e auto-oxidação do heme</i>	127
<i>II.4.1.1 Estudos da interação da HbGp com os diferentes surfactantes por absorção ótica.</i>	127
II.4.1.2 Intensidade de espalhamento de luz.....	137
<i>II.4.1.2 Estudos da interação da HbGp com os diferentes surfactantes por dicroísmo circular (CD)</i>	138
<i>II.4.1.3 Estudos da interação da HbGp com os diferentes surfactantes por fluorescência</i>	141
<i>II.4.1.4 Discussão geral sobre os resultados apresentados da interação da hemoglobina extracelular na presença dos surfactantes iônicos</i>	143

<i>II.4.2 Estudos por espalhamento de luz dinâmico e absorção ótica da hemoglobina extracelular Glossoscolex paulistus em função do pH e da temperatura.</i>	146
<i>II.4.2.1 DLS</i>	146
<i>II.4.2.2 Cromatografia em gel por exclusão de tamanho da HbGp em diferentes valores de pH</i>	150
<i>II.4.2.3 Cinética de dissociação por DLS</i>	151
<i>II.4.2.4 Estudo da dissociação e desnaturação da proteína HbGp em diferentes valores de temperatura por DLS – Ponto de fusão (“Melting point”)</i>	155
<i>II.4.2.5 Absorção ótica</i>	159
<i>II.4.2.6 Cinética de auto-oxidação acompanhada por Absorção ótica</i>	160
<i>II.4.2.7 Discussão geral dos resultados de espalhamento de luz dinâmico e absorção ótica da HbGp em função do pH e da temperatura.</i>	164
 <i>PARTE III</i>	 166
<i>III.1 Conclusões</i>	166
<i>III.1.1 Conclusão geral envolvendo os estudos de porfirinas e hemoglobina</i>	166
 <i>PARTE IV</i>	 170
<i>IV.1 Perspectivas futuras</i>	170
 <i>PARTE V</i>	 172
<i>V.1 Referências bibliográficas</i>	172

Índice de figuras

Figura 01: Estrutura das porfirinas: (A) porfirina aniônica meso-tetrakis (4-fenilsulfonato) e (B) porfirina catiônica meso-tetrakis (N-metil-4-piridil) na forma de base livre ($2H^+$).....	5
Figura 02: Vista tridimensional esquemática de uma seção da membrana plasmática.....	6
Figura 03: Estrutura dos surfactantes usados como modelo de membranas.....	7
Figura 04: Modelo de espalhamento de Raio-X de uma partícula esférica homogênea	15
Figura 05: Modelos de espectros de SAXS para partículas de tamanhos diferentes em função do ângulo de espalhamento, onde $R_{g1} < R_{g3} < R_{g2}$	17
Figura 06: Exemplos de funções de distribuição de distâncias $p(r)$ para partículas com distribuição de densidade eletrônica homogênea e não homogênea.....	19
Figura 07: Função distribuição de densidade eletrônica $\rho(r)$ de uma partícula esférica, composta por dois níveis de densidades diferentes ρ_1 e ρ_2 em relação ao meio ρ_0	20
Figura 08: Representação esquemática de um elipsóide prolato de revolução com dois níveis de densidade eletrônica diferentes ρ_1 e ρ_2 em relação ao meio ρ_0	21
Figura 09: Esquema da instrumentação usada nas medidas de SAXS.....	23
Figura 10: Espectro de absorção ótica para 10 mM de TPPS ₄ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 4.0 e 9.0, na ausência e na presença de 100 mM de CTAC. O caminho ótico utilizado foi de 4.5 μ m.....	37
Figura 11: (A) Curvas de SAXS para micelas de CTAC 100 mM na ausência e na presença de TPPS ₄ , em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 4.0. As linhas contínuas correspondem aos produtos $P(q).S(q)$ obtidos dos ajustes usando como modelo o elipsóide prolato (eq. 01). (B) Função interferência inter-partículas, $S(q)$, e função de forma da partícula, $P(q)$, obtidas dos ajustes apresentados na figura 11A.....	40

Figura 12: (A) Curvas de SAXS para micelas de CTAC 100 mM na ausência e na presença de TPPS ₄ , em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 9.0. As linhas contínuas correspondem aos produtos $P(q).S(q)$ obtidos dos ajustes usando como modelo o elipsóide prolato (eq. 01). (B) Função interferência inter-partículas, $S(q)$, e função de forma da partícula, $P(q)$, obtidas dos ajustes apresentados na figura 12A.....	41
Figura 13: (A) Curvas de SAXS simuladas pelo produto $P(q).S(q)$, considerando como parâmetros fixos os valores estipulados na figura 3A variando apenas a anisometria (v). (B) Inseto da região de valores de q entre $0.2 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$. Os demais parâmetros foram fixados em: $\sigma_{pol} = 4.0 \text{ \AA}$, $\rho_{pol} = 0.4e/ \text{ \AA}^3$, $\alpha = 0.04$, e $v = 3.0$	44
Figura 14: (A) Curvas de SAXS simuladas pelo produto $P(q).S(q)$, considerando como parâmetros fixos os valores estipulados na figura 4A variando apenas a densidade eletrônica polar (ρ_{pol}). (B) Inseto da região de valores de q entre $0.2 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$. Os demais parâmetros foram fixados em: $\sigma_{pol} = 4.0 \text{ \AA}$, $\rho_{pol} = 0.4e/ \text{ \AA}^3$, $\alpha = 0.04$, e $v = 3.0$	45
Figura 15: (A) Curvas de SAXS simuladas pelo produto $P(q).S(q)$, considerando como parâmetros fixos os valores estipulados na figura 5A variando apenas o raio parafínico (R_{par}). (B) Inseto da região de valores de q entre $0.15 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$. Os demais parâmetros foram fixados em: $\sigma_{pol} = 4.0 \text{ \AA}$, $\rho_{pol} = 0.4e/ \text{ \AA}^3$, $\alpha = 0.04$, e $v = 3.0$	45
Figura 16: Representação esquemática mostrando mudanças significativas induzidas pela adição de porfirinas (TPPS ₄) nas micelas de CTAC.....	50
Figura 17: (A) TPPS ₄ 2mM em solução aquosa ácida, pH 4.0 e (B) complexo porfirina-surfactante (4:1), também em solução ácida.....	52
Figura 18: Curvas de SAXS do surfactante SDS 40 mM (A,B,C), e 100 mM SDS (D,E), no pH 6.0, em função da concentração da porfirina TMPyP. As linhas contínuas correspondem aos ajustes do produto $P(q)S(q)$ obtidos usando o modelo do elipsóide prolato. Os parâmetros dos ajustes são dados na Tabela 2.....	55
Figura 19: Representação esquemática mostrando as mudanças mais significativas induzidas pela adição de porfirinas (TMPyP) nas micelas de SDS (ver texto acima).....	56
Figura 20: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 6.0. $[TMPyP] = 12.8 \text{ \mu M}$ e $0 < [KI] < 11.9 \text{ mM}$. O comprimento de onda de excitação é 515 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP obtidos de medidas de fluorescência no estado estacionário em solução tampão, micelas de SDS, micelas de HPS e	

micelas de TX-100. As linhas cheias em preto correspondem aos ajustes de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inseto mostrando o ajuste linear para baixas concentrações de supressor.....62

Figura 21: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TPPS₄ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 3.0. [TPPS₄] = 10 µM e 0 < [KI] < 51.0 mM. O comprimento de onda de excitação é 528 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TPPS₄ obtidos da fluorescência medida no estado estacionário em solução tampão nos valores de pH 2.0, 3.0 e 7.5. As linhas cheias em preto correspondem aos ajustes de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inseto mostrando os ajustes lineares para baixas concentrações de supressor.....67

Figura 22: (A) Espectro de emissão de fluorescência da TPPS₄ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.5. [TPPS₄] = 10 µM e 0 < [KI] < 51.0 mM. O comprimento de onda de excitação é 528 nm. (B) Gráfico de Stern-Volmer para a TPPS₄ obtidos da fluorescência medida no estado estacionário em solução tampão no pH 7.5 na presença de micelas de CTAC, HPS e TX-100. As linhas cheias em preto correspondem aos ajustes de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inseto mostrando os ajustes lineares para baixas concentrações de supressor.....68

Figura 23: Modelo esquemático da supressão de fluorescência da (A) porfirina catiônica, (B) porfirina aniônica na ausência de micelas de surfactantes; (C) a porfirina catiônica em micelas de SDS e (D) a porfirina aniônica em micelas de CTAC. O número de ânions iodeto depende da atração da porfirina ou da carga de cabeça polar dos surfactantes.72

Figura 24: (A) Espectros de absorção da TMPyP na presença de 0.24 mM de SDS em função da fração de TX-100; (B) Inseto da região das bandas Q, apresentadas em (A); [TMPyP] = 15.0 µM, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0.....75

Figura 25: (A) Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TMPyP na presença 0.24 mM de SDS em função da fração molar de TX-100. A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de TX-100, respectivamente; [TMPyP] = 15.0 µM, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0.....76

Figura 26: (A) Efeito do aumento da fração de TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de TMPyP na presença de 0.24 mM SDS em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0,

normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350$ nm (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 468$ nm em função da fração de TX-100.....	76
Figura 27: (A) Efeito da concentração da mistura de surfactantes nos espectros de absorção ótica da titulação da TMPyP (15, 0 μ M) em função das diferentes concentrações de SDS+TX-100 (0 < [80%SDS+20%TX-100] < 4.3 mM) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0, cubeta de caminho ótico 0.5 cm. (B) Deconvolução espectral das espécies envolvidas no equilíbrio: espécie I (monômeros de porfirina livre); espécie II (agregados pré-micelares de porfirina/surfactante); espécie III (monômeros de porfirina ligada às micelas mistas); (C) Frações das espécies puras presentes no equilíbrio em função da [80%SDS+20%TX-100].....	78
Figura 28: Curvas de titulação de absorção ótica para a determinação da constante de associação da TMPyP às diferentes micelas. (A) em função da [SDS]; (B) em função da [SDS+TX-100].....	79
Figura 29: (A) Efeito do aumento da concentração da micela mista SDS+TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de TMPyP em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0, normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350$ nm, [TMPyP]=15 μ M; (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 460$ nm em função da [80%SDS+20%TX-100].....	81
Figura 30: Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TMPyP em função da concentração da micela mista 80%SDS+20%TX-100. A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de micela mista, respectivamente; [TMPyP]=15.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0.....	82
Figura 31: Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TMPyP em função da concentração de SDS puro (em preto) e da micela mista 80%SDS+20%TX-100 (em vermelho). A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de surfactante, respectivamente; [TMPyP]=15.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0.....	82
Figura 32: (A) Espectros de absorção ótica da TPPS ₄ na presença de 0.12 mM de CTAC em função da fração de TX-100 e o espectro da porfirina livre em solução tampão pH 3.0 na ausência de qualquer surfactante (linha preta tracejada); (B) Inserto da região das bandas Q, apresentadas em (A); [TPPS ₄]=30.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 3.0. (C) Absorbâncias correspondentes aos espectros apresentados em (A) no comprimento de onda de 420 e 710 nm.....	87

Figura 33: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TPPS ₄ na presença de 0.12 mM de CTAC em função da fração molar de TX-100; (B) Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TPPS ₄ na presença de 0.12 mM de CTAC em função da fração molar de TX-100. A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de TX-100, respectivamente. [TPPS ₄]=30.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 3.0.....	88
Figura 34: (A) Efeito do aumento da fração de TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de 30 μ M TPPS ₄ na presença de 0.12 mM de CTAC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 3.0, normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350$ nm (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 507$ nm em função da fração de TX-100.....	89
Figura 35: (A) Espectros de absorção da TPPS ₄ na presença de 0.36 mM de CTAC em função da fração de TX-100 e o espectro da porfirina livre em solução tampão pH 7.5 na ausência de qualquer surfactante (linha preta tracejada); [TPPS ₄]=30.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.5.....	90
Figura 36: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TPPS ₄ na presença de 0.36 mM de CTAC em função da fração molar de TX-100; (B) Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TPPS ₄ na presença de 0.36 mM de CTAC em função da fração molar de TX-100. A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de TX-100, respectivamente. [TPPS ₄]=30.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.5.....	91
Figura 37: (A) Efeito do aumento da fração de TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de 30 μ M TPPS ₄ na presença de 0.36 mM de CTAC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 7.5, normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350$ nm (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 450$ nm em função da fração de TX-100.....	92
Figura 38: (A) Efeito da concentração da mistura de surfactantes nos espectros de absorção ótica da titulação da TPPS ₄ (5 μ M) em função das diferentes concentrações de CTAC+TX-100 ($0 < [60\%CTAC+40\%TX-100] < 3.0$ mM) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 3.0. (B) Deconvolução espectral das espécies envolvidas no equilíbrio: espécie I (monômeros de porfirina livre); espécie II (agregados pré-micelares de porfirina/surfactante); espécie III (monômeros de porfirina ligada às micelas mistas); (C) Frações das espécies puras presentes no equilíbrio em função da $[60\%CTAC+40\%TX-100]$	94
Figura 39: Máximos de intensidade de absorção em 434 nm (A), 490 nm (B) e 705 nm(C) obtidos das curvas da Figura 38A.....	95

Figura 40: Curva de titulação das absorvâncias em 419 nm obtidas das curvas da Figura 38A para a determinação da constante de associação da TPPS ₄ à micela mista 60%CTAC+40%TX-100.....	96
Figura 41: (A) Efeito do aumento da concentração da micela mista 60%CTAC+40%TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de TPPS ₄ em tampão acetato-fofato-borato 30 mM pH 3.0, normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350$ nm, [TPPS ₄]=5 μ M; (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 502$ nm em função da [60%CTAC+40%TX-100].....	98
Figura 42: Integral de fluorescência obtida das áreas dos espectros de emissão normalizados (A/A_0) da TPPS ₄ em função da concentração de CTAC puro (em preto) e da micela mista 60%CTAC+40%TX-100 (em vermelho). A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de surfactante, respectivamente; [TPPS ₄]=5.0 μ M, tampão acetato-fofato-borato 30 mM pH 3.0.....	99
Figura 43: Estruturas dos lipídeos utilizados neste estudo.....	103
Figura 44: Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP (5.0 μ M) em função da concentração de POPC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.0, $\lambda_{exc} = 515$ nm.....	104
Figura 45: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP (5.0 μ M) em função das diferentes concentrações de 70%POPC+30%POPG ($0 < [POPC+POPG] < 3$ mM) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.0, $\lambda_{exc} = 515$ nm. (B) Fluorescência total normalizada (A/A_0) em função da [POPC+POPG] para diferentes razões de POPC:POPG. A e A_0 são as integrais dos espectros de emissão de fluorescência na presença e na ausência de lipídeo, respectivamente. As linhas cheias correspondem aos ajustes dos pontos experimentais pela eq. (33).....	106
Figura 46: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP (5.0 μ M) em função das diferentes concentrações de POPG ($0 < [POPG] < 0.3$ mM) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.0, $\lambda_{exc} = 515$ nm. (B) Fluorescência total normalizada (A/A_0) em função da [POPG]. A e A_0 são as integrais dos espectros de emissão de fluorescência na presença e na ausência de lipídeo, respectivamente. A linha cheia corresponde ao ajuste dos pontos experimentais pela eq. (33).....	107
Figura 47: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP na presença de 1 mM de POPC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 7.0, [TMPyP] =5 μ M e $0 < [KI] < 31$ mM. O comprimento de onda de excitação é 515 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP	

obtidos de medidas de fluorescência no estado estacionário na presença de 1 mM POPC. As linhas cheias em preto correspondem ao ajuste de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inserto mostrando o ajuste linear para baixas concentrações de supressor.....109

Figura 48: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP na presença de 1 mM da mistura lipídica 70%POPC+30%POPG em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 7.0, [TMPyP] =5 μ M e 0<[KI]>65 mM. O comprimento de onda de excitação é 515 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP obtidos de medidas de fluorescência no estado estacionário na presença de 1 mM da mistura lipídica 70%POPC+30%POPG. As linhas cheias em preto correspondem ao ajuste de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inserto mostrando o ajuste linear para baixas concentrações de supressor.....111

Figura 49: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP na presença de 1 mM de POPG em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 7.0, [TMPyP] =5 μ M e 0<[KI]>120 mM. O comprimento de onda de excitação é 515 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP obtidos de medidas de fluorescência no estado estacionário na presença de 1 mM POPG. As linhas cheias em preto correspondem ao ajuste de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inserto mostrando o ajuste linear para baixas concentrações de supressor.....112

Figura 50: Estrutura quaternária da hemoglobina íntegra de *Lumbricus terrestris*, que pertence à mesma classe Oligochaeta que abrange a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, contendo 144 cadeias heme e 36 cadeias Linkers em um arranjo espacial conhecido como modelo do bracelete [104].....118

Figura 51: Espectros de absorção ótica da HbGp 0.08mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de CTAC na faixa de 0-10 mM. (A) Espectros de absorção na faixa de concentração de CTAC de 0-0.06 mM; (B) Inserto da região das bandas Q; (C) Espectros de absorção na faixa de concentração de CTAC de 0.08-10.0 mM; (D) Inserto da região das bandas Q e LMCT.....128

Figura 52: (A) Mudanças no comprimento de onda máximo da banda de Soret, (B) Absorbâncias em 415 nm e 602 nm (C) Absorbâncias em 490 nm e 700 nm em função da concentração de CTAC. Os dados apresentados para 700 nm em (C) foram multiplicados por um fator 2.15 para normalizar com o valor máximo correspondente aos dados em 490 nm. Essas mudanças correspondem aos espectros de absorção apresentados na figura 51, exceto em 490 e 700 nm

onde utilizamos os máximos encontrados nos espectros originais sem correção (ver no texto).....	129
Figura 53: Análise dos espectros de absorção mostrados na figura 51 pelo método CCA (Convex Constraint Algorithm) [91]. (A) Espectros de absorção ótica das espécies puras obtidas pelo CCA. (B) Frações das espécies puras presentes no equilíbrio em função da [CTAC].....	131
Figura 54: Espectros de absorção ótica da HbGp 0.08mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de SDS na faixa de 0-10 mM. (A) Espectros de absorção na faixa de concentração de SDS de 0-2.0 mM; (B) Inseto da região das bandas Q; (C) Espectros de absorção na faixa de concentração de SDS de 2.0-10.0 mM; (D) Inseto da região das bandas Q e LMCT.....	133
Figura 55: (A) Mudanças no comprimento de onda máximo da banda de Soret, (B) Absorbâncias em 415 nm e 608 nm (C) Absorbâncias em 490 nm em função da concentração de SDS. Essas mudanças correspondem aos espectros de absorção apresentados na figura 54.....	134
Figura 56: Espectros de absorção ótica da HbGp 0.08mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de HPS na faixa de 0-10 mM. (A) Espectros de absorção na faixa de concentração de HPS de 0-0.4 mM; (B) Inseto da região das bandas Q; (C) Espectros de absorção na faixa de concentração de HPS de 0.5-10.0 mM; (D) Inseto da região das bandas Q e LMCT.....	135
Figura 57: Análise dos espectros de absorção mostrados na figura 56 pelo método CCA (Convex Constraint Algorithm) [91]. (A) Espectros de absorção ótica das espécies puras obtidas pelo CCA. (B) Fração das espécies puras presentes no equilíbrio.....	136
Figura 58: Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbGp 0.08mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM no pH 7.0, na presença de concentrações crescentes de SDS (A) e CTAC (B). O inseto (C) corresponde à faixa de concentração de CTAC entre 0-0.95 mM. A intensidade de espalhamento foi medida a 90° no fluorímetro com os comprimentos de onda de excitação e emissão iguais e fixos em 350 nm.....	138
Figura 59: (A) Espectros de dicroísmo circular (CD) da HbGp 0.08 mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de CTAC. (B) Espectros de dicroísmo circular das espécies puras obtidas pelo CCA. (C) Frações das espécies puras presentes no equilíbrio. (D) Inseto mostrando a região de baixa concentração de CTAC expandido.....	140

Figura 60: (A) Espectros de emissão de fluorescência da HbGp 0.08 mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM no pH 7.0, em função da concentração de CTAC na faixa de concentração de 0-10 mM. (B) Áreas dos espectros de emissão, A , em função da concentração de surfactantes, normalizadas pela área da emissão do espectro da proteína na ausência de surfactante, A_0143

Figura 61: (A) Elipticidade em 222 nm para a oxi-HbGp 0.08 mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de HPS (em preto), CTAC (em vermelho) e SDS (em verde); (B) Inseto mostrando a elipticidade para baixas concentrações de surfactantes.....145

Figura 62: Variação do diâmetro hidrodinâmico (D_h) em função do tempo para $[HbGp]=0.5$ mg/ml em diferentes valores de pH, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, em $T=25^\circ C$ (A) Medidas de DLS realizadas no intervalo de 72h. (B) Cinética inicial para o intervalo de 1.5h. (C) Medidas de DLS realizadas num período de 24hs, mostrando a cinética na faixa de pH de 9.0 -10.1.....148

Figura 63: Distribuição dos tamanhos das partículas dos dados obtidos por DLS, $[HbGp]=0.5$ mg/ml, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM nos valores de pH 7.0, 9.3 e 10.7, obtidos dos dados apresentados na figura 62, utilizando o método dos cumulantes. As barras de erros correspondem aos desvios de 15 medidas diferentes. As barras de erros para a distribuição no pH 9.3 são maiores devido a grande variação do tamanho das partículas ao longo do experimento.....149

Figura 64: Cromatogramas da HbGp 6 mg/ml obtidos pela filtração em gel de Sephadex G-200 em tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 (A), pH 9.0 (B) e pH 9.6 (C). Absorção no comprimento de onda em 280 nm (círculos) e 415 nm (quadrados). Os números I, II, III, IV e V correspondem às diferentes espécies obtidas pela dissociação alcalina (ver texto). Todos os cromatogramas foram obtidos a $25^\circ C$151

Figura 65: Curvas cinéticas de dissociação da oxi-HbGp e os respectivos ajustes obtidos a partir dos dados de DLS em função do tempo no tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, em diferentes valores de pH com $T=25^\circ C$ e $[HbGp]=0.5$ mg/ml. As curvas cinéticas de dissociação da HbGp foram ajustadas pela equação 37 para obter os valores característicos de k (constante de velocidade). Todos os parâmetros de ajustes estão apresentados na Tabela 11.....153

Figura 66: Efeito da temperatura no diâmetro hidrodinâmico da HbGp 0.5 mg/ml em diferentes valores de pH, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, na faixa ácida (A) e na faixa alcalina

(B) de valores de pH. Os parâmetros críticos (temperaturas e tamanhos) estão apresentados na Tabela 12.....158

Figura 67: Espectros de absorção ótica da proteína nativa oxi-HbGp na faixa de pH 6.1 – 9.9, mostrando as mudanças espectrais nas bandas de Soret (A e C) e na região das bandas Q e LMCT (B e D). Estes espectros correspondem às medidas das amostras após 2h do preparo (A e B) e após 24 h de incubação (C e D).....161

Figura 68: Cinéticas de auto-oxidação da oxi-HbGp monitorados por absorção ótica. Absorbância em 415 nm em função do tempo, em tampão tris-HCl 30 mM, em diferentes valores de pH, [HbGp]=0.5 mg/ml; T=25°C (A) e T=38°C (B).....162

Figura 69: Constantes de velocidade, k_{obs} , nos valores de pH 9.0, 9.3, 9.6 e 9.8 obtidos dos dados de cinética de auto-oxidação da oxi-HbGp 0.5 mg/ml. A absorbância em 415 nm foi monitorada em função do tempo em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, em T=25°C e 38°C. As constantes cinéticas, k, obtidas dos dados de DLS mostrados na figura 65 estão incluídas para comparação.....164

Índice de Tabelas

Tabela 1: Valores dos parâmetros de ajuste das curvas de SAXS para 100 mM de CTAC na presença e na ausência de TPPS ₄ nas concentrações indicadas, nos valores de pH 4.0 e 9.0, obtidos através da modelagem de $P(q)$ e $S(q)$	42
Tabela 2: Valores dos parâmetros de ajuste das curvas de SAXS das amostras compostas por 40 (as primeiras três linhas) e 100 mM (as últimas duas linhas) de SDS a concentrações crescentes de TMPyP, obtidos através da modelagem de $P(q)$ e $S(q)$	55
Tabela 3: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TMPyP obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes surfactantes em diferentes valores de pH. O supressor utilizado foi o KI e $[TMPyP] = 10 \mu M$ em $T=25^{\circ}C$	63
Tabela 4: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TMPyP obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes surfactantes em diferentes valores de pH. O supressor utilizado foi o KI e $[TMPyP] = 10 \mu M$ em $T=50^{\circ}C$	64
Tabela 5: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TPPS ₄ obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes surfactantes em diferentes valores de pH. O supressor utilizado foi o KI e $[TPPS_4] = 10 \mu M$ em $T=25^{\circ}C$	69
Tabela 6: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TPPS ₄ obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes surfactantes em diferentes valores de pH. O supressor utilizado foi o KI e $[TPPS_4] = 10 \mu M$ em $T=50^{\circ}C$	70

Tabela 7: Valores da constante de associação, obtidos através dos dados de emissão de fluorescência da TMPyP em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.0, pelo ajuste utilizando a equação (33), [TMPyP]=5 μ M.....	108
Tabela 8: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TMPyP obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes lipídios. O supressor utilizado foi o KI e [TMPyP]=5 μ M em T=25°C.....	113
Tabela 9: Efeito dos surfactantes no comprimento de onda máximo de absorção, ($\lambda_{\max}$), da HbGp em tampão Tris-HCl 20 mM, obtidos dos espectros de absorção ótica.....	137
Tabela 10: Valores de diâmetro hidrodinâmico <Dh> Z-Average, coeficiente de difusão e índice de polidispersão obtidos através dos dados de DLS da hemoglobina extracelular de <i>G. paulistus</i> na sua forma oxi em diferentes valores de pH.....	149
Tabela 11: Constantes cinéticas de dissociação da HbGp em diferentes valores de pH obtidos dos dados de DLS em T=25°C.....	154
Tabela 12: Valores de tamanhos e temperaturas críticas referentes ao efeito da temperatura nos valores de diâmetro hidrodinâmico da oxi- HbGp em diferentes valores de pH, obtidos em experimentos de “melting point” descritos na Figura 66.....	159
Tabela 13: Constantes cinéticas para a auto-oxidação da HbGp em T=25°C.....	163
Tabela 14: Constantes cinéticas para a auto-oxidação da HbGp em T=38°C.....	163

Lista de abreviaturas ou siglas

TMPyP - porfirina catiônica meso-tetrakis (N-metil-4-piridil)
TPPS₄ - porfirina aniônica meso-tetrakis (4-fenilsulfonato) porfirina
FeTMPyP – porfirina Fe(III) meso-tetrakis-4-N-metil-piridil
FeTPPS₄ – porfirina Fe(III)-meso-tetra-fenil-sulfonato
cmc – concentração micelar crítica
HPS- surfactante zwitteriônico N-hexadecil-N,N,dimetil-3-amônio-1-propano sulfato
LPC - surfactante zwitteriônico lisofosfatidilcolina
TRITON X-100 – surfactante neutro t-octil-fenoxi-polietoxi-etanol
SDS – surfactante aniônico dodecilsulfato de sódio
CTAC – surfactante catiônico cloreto de cetiltrimetilamônio
RMN ¹H – ressonância magnética nuclear
RPE – ressonância paramagnética eletrônica
SANS - espalhamento de nêutron a baixo ângulos
SAXS - Espalhamento de Raio-X a Baixos Ângulos
POPC - 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-fosfocolina
POPG - 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicero)]
KI – Iodeto de potássio
HbGp - Hemoglobina extracelular da *Glossoscolex paulistus*
HbLt – Hemoglobina extracelular da *Lumbricus terrestris*
DLS – Espalhamento de luz dinâmico
CD – Dicroísmo circular

Resumo

Na primeira parte deste trabalho foi estudada a interação da porfirina catiônica meso-tetrakis N-metil-4-piridil (TMPyP) e a porfirina aniônica meso-tetrakis 4-fenilsulfonato (TPPS₄) nas formas de base livre com sistemas modelos de membrana biológica (micelas iônicas, micelas mistas e vesículas de fosfolípidios) em soluções aquosas, através das técnicas de absorção ótica, espalhamento de luz ressonante (RLS do inglês “resonante light scattering), fluorescência e SAXS, do inglês “Small Angle X-Ray Scattering”. As curvas de SAXS das micelas catiônicas de CTAC (cloreto de cetiltrimetilamônio) foram ajustadas como um elipsóide prolato na ausência e na presença de 2-10 mM de TPPS₄. Os dados de SAXS mostraram que a presença da porfirina TPPS₄ modifica o centro hidrofóbico micelar, levando a formação de micelas menores. Através das análises dos dados de SAXS das micelas de SDS (dodecilsulfato de sódio) observamos que a forma da micela na ausência e na presença de 2-10 mM TMPyP apresenta a forma de um elipsóide prolato sem mudanças. Entretanto, o coeficiente de ionização, diminuiu com o aumento da concentração de porfirina, sugerindo a “blindagem” da carga aniônica do SDS pela porfirina catiônica. A supressão de fluorescência da TPPS₄ e TMPyP foi estudada na ausência e na presença de diferentes micelas de surfactantes, tais como as de SDS, CTAC, HPS (N-hexadecil-N,N,dimetil-3-amônio-1-propano sulfato) e TX-100 (t-octil-fenoxi-polietoxi-etanol). O iodeto de potássio (KI) foi utilizado como supressor. Os gráficos de Stern-Volmer dos dados de fluorescência no estado estacionário foram ajustados pela equação quadrática, incluindo a supressão dinâmica (K_D) e estática (K_S). Os valores de K_S são muito menores do que os valores de K_D. Os resultados da TMPyP são consistentes com as constantes de ligação reportadas na literatura: uma redução significativa de supressão acontece para a TMPyP na presença de SDS, e uma redução moderada é observada para o sistema TMPyP-HPS e quase nenhuma mudança é vista para a TMPyP na presença de TX-100. Para o sistema CTAC-TPPS₄ um aumento na supressão foi observado quando comparada com a TPPS₄ em tampão puro. Isto provavelmente é associado ao acúmulo de iodeto na interface da micela catiônica. A atração entre a cabeça polar do CTAC e I⁻, e a repulsão entre SDS e I⁻, aumenta e reduz a supressão de fluorescência, respectivamente, das porfirinas que se localizam na interface micelar. A pequena supressão da TPPS₄ em TX-100 é coerente com a forte ligação entre a TPPS₄-TX-100 reportada na literatura. A TPPS₄ e a TMPyP na presença de concentrações baixas dos surfactantes CTAC e SDS, respectivamente, apresentaram formação de agregados pré-micelares. A adição de surfactante neutro, TX-100, reduziu o efeito de agregação, acompanhada pelas várias técnicas espectroscópicas utilizadas neste trabalho. Portanto, sob condições onde temos a máxima formação de agregados (porfirina-surfactante), a titulação da TPPS₄ com micelas de 40%CTAC-60%TX-100 e a TMPyP com micelas de 80%SDS-20%TX-100 não foi suficiente para eliminar a agregação, apesar da diminuição significativa do efeito de supressão de fluorescência e da intensidade de luz espalhada. A interação da TMPyP com 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-fosfolina (POPC), 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicero)] (POPG) e a mistura POPC + POPG é predominantemente devido à contribuição de eletrostática. O aumento da carga negativa, devido à adição de POPG, favorece a interação das vesículas com a porfirina catiônica. Na segunda parte deste trabalho foram estudados os efeitos de três surfactantes na estrutura oligomérica da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) na sua forma oxi. O estudo com o SDS, CTAC e HPS permitiu diferenciar os efeitos de cargas opostas da cabeça polar dos surfactantes na dissociação da estrutura oligomérica e na auto-oxidação da hemoglobina. A interação do HPS com HbGp foi claramente menos intensa que a

interação desta hemoglobina com os surfactantes catiônico (CTAC) e aniônico (SDS). Provavelmente, esta menor interação da HbGp com HPS, quando comparada com o SDS e o CTAC, é devido a menor atração eletrostática entre o HPS e os sítios iônicos da proteína. Dados espectroscópicos foram discutidos e comparados com os da literatura, afim de compreender a interação hemoglobina-surfactante, e como o ponto isoelétrico ácido (pI) pode influenciar na relação da estrutura-atividade das hemoglobinas gigantes extracelulares. As amostras de HbGp foram estudadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS do inglês “Dynamic light scattering”). Na faixa de pH 6.0 a 8.0, HbGp é bastante estável e a distribuição de tamanho das partículas é monodispersa com um diâmetro hidrodinâmico médio (D_h) de 27 nm. O aumento dos valores de pH (pH>9.0) induziu um processo de dissociação irreversível, resultando num valor do D_h menor (10 nm). A diminuição do D_h sugere uma dissociação completa da hemoglobina. Em pH 9,0 a cinética de dissociação é lenta, com um mínimo 24 h para ser completada. As constantes cinéticas de dissociação aumentam progressivamente, com o aumento do valor do pH. As curvas de melting point para HbGp apresentaram dissociação oligomérica e desnaturação da proteína em função do pH. Os processos de auto-oxidação e dissociação estão intimamente relacionados, de modo que a dissociação da proteína oligomérica promove um aumento na velocidade de auto-oxidação e vice-versa.

Abstract

In the first part of this work interactions of the cationic meso tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin (TMPyP) and meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS₄) in the free base forms with membrane model systems (ionic micelles, mixed micelles and phospholipids vesicles) in aqueous solutions, have been investigated by optical absorption, resonance light scattering (RLS), fluorescence and SAXS (Small Angle X-Ray Scattering). The best-fit SAXS curves were obtained assuming for cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) micelle a prolate ellipsoidal shape in the absence and upon incorporation of 2-10 mM TPPS₄. SAXS results show that the presence of TPPS₄ impacts on micellar hydrophobic core, leading to a micellar reassembling into smaller micelles. SAXS data analysis demonstrated a prolate ellipsoidal shape for sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles; no significant changes in shape and size were observed for SDS-TMPyP co-micelles. Moreover, the ionization coefficient, α , decreases with the increase of the porphyrin concentration, suggesting the “screening” of the anionic charge of SDS by the cationic porphyrin. These results are consistent with optical absorption, fluorescence and RLS spectroscopies data, allowing to conclude that neutral surfactants present a smaller interaction with the cationic porphyrin as compared with ionic surfactants. Fluorescence quenching of TPPS₄ and TMPyP is studied in aqueous solution and upon addition of micelles of SDS, CTAC, *N*-hexadecyl-*N,N*-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS) and *t*-octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100). Potassium iodide (KI) was used as quencher. Steady-state Stern-Volmer plots were best fitted by a quadratic equation, including dynamic (K_D) and static (K_S) quenching. K_S was significantly smaller than K_D . For TMPyP quenching results are consistent with reported binding constants: a significant reduction of quenching takes place for SDS, a moderate reduction is observed for HPS and almost no change is seen for Triton X-100. For CTAC-TPPS₄ system an enhancement of quenching was observed as compared to pure buffer. This is probably associated to accumulation of iodide at the cationic micellar interface. The attraction between CTAC headgroups and I⁻, and repulsion between SDS and I⁻, enhances and reduces the fluorescence quenching, respectively, of porphyrins located at the micellar interface. The small quenching of TPPS₄ in Triton X-100 is consistent with strong binding as reported in the literature. Anionic TPPS₄ and cationic TMPyP in the presence of low concentrations of the surfactants CTAC and SDS, respectively, showed formation of aggregates, monitored by optical absorption, fluorescence and resonance light scattering intensity (RLS). The addition of nonionic surfactant, Triton X-100, reduced the effect of aggregation monitored by the various techniques used in the present work. Therefore, under conditions for the maximum of aggregate formation (porphyrin-surfactant), apparently, the CTAC: TX-100 ratio equal to 40:60 and SDS:TX-100 ratio equal to 80:20 are not sufficient to eliminate aggregation, despite the significant decrease of the quenching effect of fluorescence and of the light scattering intensity. The interaction of TMPyP with 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (POPC), 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)] (POPG) and the mixture POPC+POPG is predominantly due to the electrostatic contribution. The increase of the negative charge, due to addition of POPG, favors the interaction of vesicles with the cationic porphyrin. On the second part of this work the effects of three surfactants upon the oligomeric structure of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) in the oxy – form was studied. The use of SDS, CTAC and HPS has allowed to differentiate the effects of opposite headgroup charges on the oligomeric structure dissociation and hemoglobin autoxidation. Furthermore, the interaction of HPS with HbGp was clearly less

intense than the interaction of this hemoglobin with cationic (CTAC) and anionic (SDS) surfactants. Probably, this lower interaction with HPS is due to the lower electrostatic attraction between the HPS surfactant and the protein surface ionic sites when compared to the electrostatic interaction between HbGp and cationic and anionic surfactants. Spectroscopic data are discussed and compared with the literature in order to improve the understanding of hemoglobin-surfactant interaction as well as the acid isoelectric point (pI) influence of the giant extracellular hemoglobins on its structure-activity relationship. HbGp samples were studied by dynamic light scattering (DLS). In the pH from range 6.0 to 8.0, HbGp is stable and a monodisperse size distribution with a z-average hydrodynamic diameter (D_h) of 27 ± 1 nm is observed. More alkaline pH (pH > 9.0) induced an irreversible dissociation process, resulting in smaller D_h of 10 ± 1 nm. D_h decrease suggests a complete hemoglobin dissociation. At pH 9.0 the dissociation kinetics is slow, taking a minimum of 24 h to be completed. Dissociation rate constants progressively increase at higher pH. Melting curves for HbGp showed oligomeric dissociation and protein denaturation as a function of pH. Autoxidation and dissociation processes are intimately related, so that oligomeric protein dissociation promotes the increase of autoxidation rate and vice-versa.

PARTE I**I.1. Introdução****I.1.1 Porfirinas**

As porfirinas compreendem uma classe muito importante de moléculas que estão presentes em muitos sistemas biológicos. Como exemplo, podemos citar a Fe-porfirina (correspondente a proto-porfirina-IX), que constitui o sítio ativo de hemoproteínas, o qual é responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio na hemoglobina e mioglobina, respectivamente. A Fe-porfirina também está presente no citocromo, sendo responsável pela transferência de elétrons na cadeia respiratória [1]. Na clorofila também encontramos um derivado de porfirina, a Mg-porfirina, associada ao processo de fotossíntese [2]. Estas duas porfirinas, a proto-porfirina IX e a Clorofila, são conhecidas como moléculas vitais, sendo responsáveis pela manutenção, em nível fisiológico, das principais formas de vida, tanto no mundo animal como no vegetal.

As porfirinas são alvos de diferentes campos de interesse, obtendo diversas aplicações, as quais têm aumentado constantemente com o decorrer dos anos. Uma de suas aplicações mais importantes se encontra na área da medicina, no tratamento de câncer (Terapia fotodinâmica do câncer – PDT [3]).

Devido as suas propriedades físico-químicas, tais como, alta afinidade por tecidos tumorais, atividade fotodinâmica, intensa absorção na região espectral onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes (≥ 600 nm), alta fotoestabilidade, rendimento quântico do estado triplete e singleto altos, e paramagnetismo dependendo da porfirina, a classe das porfirinas tem sido amplamente estudada com vistas a sua aplicação como fármaco [3-6].

Entretanto as porfirinas podem causar efeitos colaterais quando inseridas na corrente sanguínea. Os efeitos biológicos das porfirinas e derivados dependem fortemente de suas propriedades físico-químicas, em particular, da dimerização, da agregação, da coordenação axial e da afinidade pelas diferentes estruturas biológicas.

As porfirinas são um exemplo típico de cromóforo que mostra a tendência de formar diferentes tipos de agregados [7-9] com propriedades espectroscópicas diferentes. Em particular a

formação do agregado altera seus espectros de absorção e emissão [10,11], rendimento quântico, tempo de vida do estado singlete e triplete, bem como a produção de oxigênio singlete molecular [12,13], solubilidades em água e outras características. A formação destes agregados em solução aquosa depende da estrutura e dos substituintes periféricos da porfirina, força iônica, temperatura, pH e da presença de surfactantes.

No entanto, como o estudo das membranas biológicas é de grande complexidade, tornou-se necessário e bastante comum o uso inicial de modelos mais simples para a investigação dos fenômenos relacionados com as membranas em nível molecular. Portanto, o estudo sobre a interação de porfirinas solúveis em água com as membranas modelo, tem sido realizado para se determinar: como a incorporação da porfirina na membrana depende da estrutura molecular e de suas características eletrônicas; como este composto interage com as membranas; e onde na membrana ou na interface membrana-água este composto tetrapirrólico se localiza.

A interação de porfirinas sintéticas solúveis em água com micelas tem sido claramente mostrada [14,15]. Na presença de surfactantes iônicos abaixo de sua concentração micelar crítica (cmc), a TPPS₄ (porfirina aniônica meso-tetrakis (4-fenilsulfonato) [16,17] e seus derivados metálicos FeTPPS₄ e ZnTPPS₄ [18], e a TMPyP (porfirina catiônica meso-tetrakis (N-metil-4-piridil) [19] e seu derivado FeTMPyP [20] e algumas porfirinas meso-tetra-aryl-substituídas [21] formam agregados. Acima da cmc, as micelas são geralmente consideradas apenas como um meio para solubilizar os agregados de porfirina em monômeros ou dímeros.

Recentemente usando técnicas espectroscópicas de absorção ótica, fluorescência, RPE (ressonância paramagnética eletrônica), RMN ¹H (ressonância magnética nuclear) e espalhamento de luz, tem sido explicitado que as porfirinas solúveis em água meso-tetrakis (4-metil-N-piridil) - (TMPyP) e as porfirinas meso-tetrakis (4-sulfonato-fenil) - TPPS₄ na forma de base livre e complexadas com Fe(III) e Mn(III) podem interagir com ácidos nucleicos [22-25] e com a albumina de soro bovino, que é a principal proteína do plasma sangüíneo [26,27], respectivamente. Nos últimos anos, em trabalhos do grupo, temos descrito as propriedades desta porfirinas em solução bem como o fenômeno de sua agregação.

A interação da porfirina solúvel em água Fe(III) meso-tetrakis-4-N-metil-piridil (FeTMPyP) com diferentes surfactantes foi estudada [20]. A presença de três espécies diferentes de FeTMPyP em micelas aniônicas de dodecilsulfato de sódio (SDS) foi demonstrada: monômeros ou dímeros de metaloporfirinas livres (dependendo do pH), monômeros ou possíveis

dímeros de metaloporfirina ligados às micelas e agregados de metaloporfirina/surfactante não micelar. Estes resultados foram similares aos obtidos sobre a interação da porfirina aniônica Fe(III)-meso-tetra-fenil-sulfonato (FeTPPS₄) [18]. A formação de agregados ocorre para uma ampla faixa de razão surfactante/porfirina para ambos os valores de pH 2.0 e 9.0. No caso das micelas zwitteriônicas de N-hexadecil-N,N,dimetil-3-amônio-1-propano sulfato (HPS), lisofosfatidilcolina (LPC), e micelas neutras de t-octil-fenoxi-polietoxi-etanol (TRITON X-100) a formação de agregados não foi observada. A constante de associação estimada com base nos dados de absorção ótica foi da ordem de $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para o SDS. Comparando estes resultados com os obtidos para a porfirina aniônica FeTPPS₄ observa-se que ambos os fatores eletrostáticos e hidrofóbicos são relevantes para a interação porfirina-surfactante; para a porfirina aniônica FeTPPS₄ as constantes de associação com o surfactante catiônico cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC) e o zwitteriônico HPS são da ordem de 10^4 M^{-1} .

Esta diferença na associação das porfirinas com os surfactantes pode estar relacionada com o fato de que, apesar da carga formal dos grupos periféricos das porfirinas (catiônica e aniônica) serem praticamente iguais, estereoquimicamente a carga negativa dos grupos sulfonatos é mais exposta a um ataque eletrofílico do que para a carga positiva dos grupos metil-piridil. Isto pode ser tanto devido ao sistema conjugado do anel porfirínico, no qual a carga positiva está delocalizada por todo o sistema, quanto à presença do grupo metil ligado ao nitrogênio, e bloqueando o acesso direto de cargas negativas necessário a uma pronunciada interação eletrostática. Este efeito decresce, com a diminuição do caráter catiônico dos substituintes. Sendo assim a carga da FeTMPyP é mais dividida e bloqueada, comparada a carga da FeTPPS₄, apresentando esta uma maior interação eletrostática com a vizinhança. Os nossos resultados de RMN ¹H indicaram que a FeTMPyP se localiza principalmente no centro hidrofóbico das micelas de SDS, como observado para FeTPPS₄ nas micelas de CTAC [18,20].

A interação da porfirina catiônica TMPyP com surfactantes iônico e não iônicos [19] foi bastante similar ao descrito para a metaloporfirina FeTMPyP. A presença de três espécies de TMPyP em micelas de SDS foi demonstrada: monômeros de TMPyP livre, monômeros de porfirinas ligados às micelas de SDS e agregados pré-micelares de TMPyP-SDS. A razão [SDS]/[TMPyP] para a faixa de máxima formação de agregados foi de 16-19:1 para pH 6.0, o pH estudado, pois para uma ampla faixa de pH (2-11) há apenas uma única espécie presente em solução. Enquanto que a razão [CTAC]/[TPPS₄] para a máxima formação de agregados foi de 4-

5:1 e 14:1 à pH 3.0 e 7.5, porfirina protonada e deprotonada, respectivamente [16]. Sendo assim a razão surfactante/porfirina, na sua forma deprotonada, para ambas as porfirinas, apresentam valores próximos. No entanto quando a porfirina TPPS₄ está na forma protonada a razão é de 4:1, indicando a importância da carga total da porfirina na interação com as micelas. No caso da TMPyP na presença de surfactante zwitteriônico e neutro, HPS e TRITON X-100, respectivamente, não foi observada a formação de agregado. A constante de associação estimada para a interação da TMPyP com SDS foi da ordem de 10^3 M^{-1} [19]. Enquanto que para a TPPS₄, as constantes de associação na presença de CTAC e HPS foram da ordem de 10^4 M^{-1} [16], e na presença de TRITON X-100 a constante deve ser cerca de uma ou duas ordens de magnitude menor. A solubilização da TPPS₄ dentro das micelas é determinada em geral por forças hidrofóbicas e moduladas por fatores eletrostáticos. Já para a TMPyP nós observamos uma menor contribuição da hidrofobicidade do anel porfirínico quando comparado com a porfirina aniônica. Uma vez que a TMPyP praticamente não interage com as micelas não iônicas e nem com a zwitteriônica.

Neste trabalho de doutorado estudamos a interação da porfirina catiônica (TMPyP) e aniônica (TPPS₄) (Figura 01) com modelos mais próximos da membrana biológica, ou seja, com as micelas mistas e com vesículas de fosfolípidios. Várias porfirinas sintéticas e naturais incorporadas dentro de micelas e bicamadas lipídicas tem sido extensivamente usadas com propósitos biomiméticos [28-30]. Processos de separação de carga e transferência de elétrons fotoinduzidos têm sido pesquisados extensivamente em soluções microheterogêneas incluindo micelas e vesículas. Interação de vários solutos com a fase micelar bem como com vesículas e encapsulação de moléculas dentro das micelas e vesículas são estudadas como modelos para as biomembranas ou com formação de complexos molécula-proteína. Os mecanismos dos efeitos das porfirinas são totalmente diferentes, podendo se localizar na parte hidrofóbica ou parte hidrofílica das membranas, dependendo da característica das porfirinas [31-36].

Assim, o estudo da interação destas porfirinas (Fig.01) com sistemas modelo de membrana nos permite avaliar as constantes de associação, valores de pK_a , etc, possibilitando a compreensão das propriedades físico-químicas das mesmas em presença de sistemas biomiméticos das células, fornecendo subsídios para avaliar a sua aplicação nas diversas áreas biomédicas e biológicas. Existem estudos descritos na literatura sobre a interação de porfirinas com sistemas micelares [14,15,35,37-40] e em vesículas, porém ainda não estão totalmente

esclarecidos os mecanismos de interação e as condições em que ocorre o fenômeno de agregação, o que é muito relevante nas aplicações biomédicas.

Figura 01: Estrutura das porfirinas: (A) porfirina aniônica meso-tetrakis (4-fenilsulfonato) e (B) porfirina catiônica meso-tetrakis (N-metil-4-piridil) na forma de base livre (2H^+).

I.1.2. Modelos biomiméticos de Membranas Biológicas

As membranas celulares contêm proteínas, uma quantidade variável de fosfolipídios e algumas vezes pequenas quantidades de carboidratos. Segundo o modelo de Singer e Nicolson, a matriz da membrana biológica é uma bicamada de fosfo- e glicolipídios na qual estão incorporadas as proteínas [41]. Na figura 02 está apresentada esquematicamente a membrana.

Os lipídeos formam um grupo heterogêneo de moléculas no qual se incluem hidrocarbonetos, pigmentos, colesterol, fosfolipídios, glicolipídios e detergentes. Esses compostos contêm um grupo apolar de natureza alifática ou aromática e muitos também possuem um grupo polar. A parte alifática é hidrofóbica, pouco solúvel em água e solúvel em muitos solventes apolares. Os grupos polares podem ser carregados, tais como os grupos fosfato, amino, sulfato e carboxil, ou neutro como os grupos hidroxila, carbonila e éster. Os grupos hidrofílicos são denominados de “cabeça” polar enquanto os hidrofóbicos são chamados de “cauda”. As moléculas que possuem estes dois grupos são denominadas de anfífilas. Moléculas anfífilas incluem sabões, detergentes e os fosfolipídios que dão a estrutura básica para as membranas biológicas [41,42].

Como dito anteriormente, o estudo das membranas biológicas é de grande complexidade, desta forma tornou-se necessário o uso de modelos mais simples para a investigação dos fenômenos relacionados com as membranas em nível molecular. Portanto, têm-se utilizado freqüentemente micelas, bicamadas planas, vesículas, lipossomas e monocamadas para estudar um grande número de fenômenos que ocorrem nas membranas.

Figura 02: Vista tridimensional esquemática de uma seção da membrana plasmática [35].

1.1.2.1. Micelas

Quando moléculas anfifílicas são dissolvidas em água elas podem se separar do solvente pela auto-agregação. Microscopicamente ocorre a formação de duas fases. Os produtos agregados são conhecidos como micelas. Por definição, micelas são agregados coloidais, estáveis termodinamicamente que são espontaneamente formados quando se atinge uma determinada concentração de anfifílico em solução, isto é, uma concentração micelar crítica (cmc).

A estrutura das micelas mimetiza a estrutura da membrana, tendo em vista basicamente a presença de três regiões distintas:

- (A) Região interna hidrofóbica, formada pela parte apolar das moléculas anfifílicas
- (B) Região superficial, formada pela cabeça polar dos surfactantes

(C) Camada de Stern, entre a parte polar e o meio aquoso onde existe uma região intermediária caracterizada por um alto gradiente de constante dielétrica, o qual depende da força iônica do meio.

Neste trabalho foram estudados os surfactantes iônicos CTAC (catiônico), HPS (zwitteriônico), SDS (aniônico), e TRITON X-100 (neutro) (fig. 03), na forma de micelas, como modelos simples de membrana, a fim de obter uma melhor compreensão da interação das porfirinas TPPS₄ e TMPyP com as membranas celulares.

Figura 03: Estrutura dos surfactantes usados como modelo de membranas.

1.1.2.2. Micelas Mistas

Como já foi dito anteriormente, os surfactantes em solução aquosa apresentam uma tendência em formar micelas, a qual é refletida pela concentração micelar crítica, cmc, a forma e a distribuição do tamanho das micelas são determinadas após a cmc. A forma e o tamanho das micelas estão diretamente relacionados com a viscosidade e outras características das soluções micelares, as quais são muito importantes para aplicações envolvendo surfactantes [43]. As misturas de surfactantes podem ser um meio muito conveniente para otimizar as propriedades de soluções micelares, assim as mudanças da composição da solução, podem adaptar eficientemente a característica desejada no limite necessário. Por exemplo, adição de surfactante não iônico a um

surfactante iônico em solução pode reduzir significativamente a cmc da mistura e aumentar o tamanho das micelas. Vários estudos sobre a física e a química destas micelas mistas de surfactantes têm sido descritos [43,44]. Nos últimos anos descobriu-se que a composição das micelas mistas depende da concentração micelar crítica, a micela aumenta de tamanho com o aumento da concentração de surfactante e com o aumento da temperatura, e o mais importante é que as micelas mistas são termodinamicamente estáveis [44,45].

O TRITON X-100 (TX-100) é um surfactante não iônico largamente usado em processos bioquímicos e químicos. Este surfactante é bastante utilizado em estudos de micelas mistas. Recentemente, Hong-Chang Gao e colaboradores [46] mostraram que micelas mistas são uniformemente formadas em soluções de TX-100 + CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Foi observada uma interação entre os prótons hidrofóbicos e entre os prótons hidrofílicos dos dois surfactantes. A cabeça polar do CTAB é situada entre o primeiro grupo oxietileno próximo do anel fenoxi do TX-100. Observaram também que o aumento da concentração CTAB nas micelas de TX-100 modifica a camada polar empacotada da micela de TX-100 estendendo gradualmente a cadeia hidrofílica da micela de TX-100. Estudos anteriores observaram que a micela de TX-100 apresenta a cadeia hidrofílica de polioxetileno enrolada. Formando uma “casca grossa” ao redor do centro micelar hidrofóbico (camada de Stern). Estas informações foram obtidas através das análises de ressonância magnética de próton, RMN ^1H , e da técnica de ressonância magnética nuclear bidimensional baseada no efeito Overhauser conhecida como 2D NOESY [46]. Existem evidências da solubilização de moléculas de SDS dentro do centro hidrofóbico de micelas de TX-100 e de que a cadeia hidrofóbica do SDS não fica estendida no centro hidrofóbico da micela mista. Observaram também que o grupo metileno próximo da cabeça polar do SDS está localizado entre o anel fenoxi do TX-100 na micela mista e que a cadeia hidrofílica do TX-100 na micela mista permanece enrolada com o aumento da concentração de SDS, ao contrário do que foi observado para o SDS [47]. Entretanto a estrutura e o tamanho destas micelas mistas permanecem não esclarecidos.

Garamus [45] tem usado o TX-100 como surfactante não iônico em estudo de sistemas mistos de surfactante TX-100+1-bromo-4-tridecilpiridina (TPB) através de espalhamento de nêutron a baixo ângulo (SANS). Neste trabalho o autor observou que micelas mistas com tamanho maior do que as micelas simples foram formadas com os dois tipos de surfactante; entretanto, a forma e o arranjo destas micelas mistas não foram esclarecidos [45].

Trabalhando-se com micelas mistas, onde teríamos na parte polar das micelas grupos carregados e neutros, estaríamos com um modelo biomimético muito mais próximo das membranas biológicas. Além disso, os efeitos de agregação observados para os surfactantes iônicos puros de cargas opostas à das porfirinas, poderiam ser modificados e, eventualmente evitados.

As micelas mistas utilizadas neste trabalho foram: CTAC/TRITON X-100 e SDS/TRITON X-100, pois é conhecido que a TPPS₄ e a TMPyP interagem fortemente com CTAC e SDS respectivamente, formando agregados pré-micelares [16,18-20]. Entretanto, a porfirina aniônica também interage com TRITON X-100, mas não forma agregados. Assim, nosso propósito foi de verificar qual o efeito provocado pela adição de TRITON X-100 em diferentes proporções e como este afetaria a formação de agregados pré-micelares, porfirina-surfactante.

1.1.2.3. Vesículas de Fosfolipídios

Apesar das micelas serem utilizadas como sistemas modelos para membranas naturais, os lipossomas são considerados como sistemas que se aproximam mais das membranas, devido ao fato destas estruturas se organizarem em forma de bicamadas que, em princípio, é bem semelhante à porção lipídica das membranas celulares, nas quais estão incorporadas as proteínas [48].

Lipossomos são definidos como vesículas lipídicas, formadas espontaneamente quando os lipídios estão dispersos em meio aquoso, podendo apresentar tamanhos diferentes e ser constituídos por várias bicamadas lipídicas (multilamelares) [48]. Os lipossomos são caracterizados por sua composição lipídica, seu diâmetro médio e pela heterogeneidade dos tamanhos destes agregados em solução [49]. A semelhança entre os lipossomos e as membranas naturais contribui para que os primeiros sejam empregados como veículos de transporte de drogas, sendo um método vantajoso nas aplicações medicinais, pois reduzem as dosagens a serem utilizadas e diminuem os efeitos alérgicos, tóxicos e colaterais das mesmas [49].

Os fosfolipídios são os maiores constituintes estruturais das membranas biológicas. A molécula anfifílica de fosfatidilcolina é considerada o fosfolipídio mais comum, sendo constituída por uma molécula de glicerol que funciona como uma ponte unindo dois grupos

alquilas que fazem parte de duas longas cadeias hidrocarbônicas, contendo um grupo polar hidrofílico [50]. Na estrutura de uma vesícula de fosfolípidios as cadeias hidrocarbônicas alinham-se para o interior formando uma bicamada, enquanto que os grupos polares estão expostos às fases aquosa interna e externa da mesma. De maneira semelhante às micelas, as vesículas são consideradas sistemas atraentes, pois possuem a capacidade de compartimentar reagentes, isto é, sua localização pode estar restrita às seguintes regiões: a) no interior da região hidrofóbica do lipídio; b) na região dos grupos polares do mesmo; c) na fase aquosa interna ou na externa da vesícula [48,50].

Semelhantemente ao que ocorre nas micelas, a força hidrofóbica pode ser considerada como sendo o fator responsável pela agregação dos fosfolípidios, pois minimiza o contato entre a parte apolar do lipídio e a água. Outros fatores são responsáveis pelo processo de agregação, como por exemplo, as forças de Van der Waals (entre as cadeias hidrofóbicas) e as interações intermoleculares na região do grupo cabeça polar, incluindo a hidratação, e a possível formação de pontes de hidrogênio entre os grupos polares vizinhos. A água pode ser requerida para agir como espaçador ou como ponte entre as cabeças de grupos adjacentes [49].

Os agregados lipídicos podem apresentar mais de um tipo de estrutura organizada quando hidratados; a forma predominante depende da variação de parâmetros como a concentração do lipídio, temperatura, pressão, força iônica e pH [49].

Os lipossomas podem ser empregados para estudar a interação de uma substância química com o sistema biológico, com o intuito de compreender o mecanismo de ação farmacológica de muitas drogas, visto que o mesmo é, em muitos casos, desconhecido por não se saber se ocorre devido à ligação da droga à membrana ou se são promovidas modificações em sua estrutura ou ainda se o efeito farmacológico está associado à interação com o fosfolipídio ou com a proteína da membrana. Neste estudo nosso objetivo é ampliar nossos conhecimentos sobre a interação de porfirinas solúveis em água com tais sistemas, comparando os resultados obtidos com os descritos anteriormente para micelas aquosas.

I.2. Objetivos

Neste trabalho o nosso objetivo foi estudar a interação da porfirina catiônica meso-tetrakis (4-methylpyridyl), TMPyP, e a porfirina aniônica meso-tetrakis (p-fenilsulfonato) nas formas de base livre (TPPS₄), com modelos biomiméticos de membrana biológica, como as micelas iônicas, micelas mistas e vesículas de fosfolipídios. Este estudo foi realizado aplicando-se as técnicas espectroscópicas de absorção ótica, fluorescência, espalhamento de luz ressonante, e a técnica estrutural de SAXS (Espalhamento de raios-X à baixo ângulo).

I.2.1 Objetivos específicos

- 1) Através dos experimentos de SAXS nosso objetivo foi investigar como a presença de porfirinas modifica as estruturas das micelas iônicas.
- 2) Determinar as propriedades físico-químicas destas porfirinas na presença das micelas mistas e/ou vesículas de fosfolipídios, comparando a agregação das porfirinas catiônicas e aniônicas na forma de base livre. Observando se a presença de micelas mistas altera a formação dos agregados pré-micelares, ou mesmo se inibe a sua formação.
- 3) Realizar medidas de supressão de fluorescência, com o objetivo de determinar a localização das porfirinas nos diferentes sistemas modelos, ou seja, se estas se localizam na região hidrofóbica ou próxima da interface micelar.

Os experimentos de absorção ótica, fluorescência e espalhamento de luz ressonante foram desenvolvidos no laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Química de São Carlos-USP. Os experimentos de espalhamento de Raio-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizados no Laboratório Nacional Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP em colaboração com o Profa. Dra. Rosângela Itri do Instituto de Física da USP de São Paulo. As medidas de tempo de vida de fluorescência no domínio da frequência também foram realizadas no LNLS.

I.3. Materiais e Métodos

I.3.1. Materiais

As porfirinas (Midcentury chemicals, USA), sais de acetato, fosfato e borato de sódio (Mallinckrodt) foram usados sem purificação. Os surfactantes SDS e TRITON X-100 foram obtidos da Sigma Chem. Co (USA), e o surfactante CTAC da Acros Organics (New Jersey, USA). Os surfactantes CTAC, SDS e TRITON X-100 foram utilizados sem purificação. Os lipídeos utilizados foram obtidos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

Os valores de pH das soluções foram ajustados por meio do pHmetro Corning modelo 130 equipado com eletrodo semimicro de vidro combinado com o eletrodo de referência de Ag/AgCl. As soluções foram equilibradas com 48hs de antecedência as medidas.

I.3.1.1. Preparação das amostras

I.3.1.1.1. Preparação das amostras de porfirinas com micelas de SDS e CTAC para as medidas de SAXS

As amostras para as medidas de SAXS foram preparadas em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM usando-se água milli-Q como solvente. Soluções estoques de porfirinas foram preparadas pesando-se uma quantidade de porfirina para obter uma solução estoque de 10mM. As outras concentrações foram obtidas por diluição da solução estoque para 2 e 5 mM. Cada amostra teve um volume final de 0.6 mL. Para os experimentos com surfactantes amostras individuais de 0.6 mL em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM foram preparadas com concentrações fixas de porfirina (2-10 mM) e concentrações fixas dos surfactantes (100 mM de CTAC e 40 e 100 mM de SDS).

I.3.1.1.2. Preparação das amostras de porfirina com micelas iônicas, zwitteriônicas, neutras e mistas

As amostras de porfirinas com micelas mistas para as medidas de absorção ótica, fluorescência e espalhamento de luz ressonante foram preparadas da seguinte maneira: primeiramente preparou-se uma solução de TMPyP e outra de TPPS₄ com concentração na faixa de 10-15 μM utilizando-se o $\epsilon_{422} = 2.26 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a TMPyP no pH 6.0, e $\epsilon_{435} = 3.92 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ no pH 4.0 e $\epsilon_{413} = 5.42 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ no pH 7.5 para a TPPS₄. Foram preparadas diferentes amostras de porfirina de volume 1.0 mL com adição de surfactantes de carga oposta, ou seja, na solução de porfirina TMPyP foi adicionada solução estoque de SDS e na solução TPPS₄ adicionou-se solução estoque de CTAC para razões de surfactante/porfirina = 16 para o sistema SDS/TMPyP, e 4:1 para o sistema CTAC/TPPS₄. Estas amostras foram incubadas por 24h e protegidas da luz. Após 24h adicionou-se diferentes concentrações de TX-100. A solução estoque de TX-100 foi preparada a partir do seu coeficiente de absorção molar $\epsilon_{277} = 1450 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ [51].

As amostras de porfirina na ausência e na presença de surfactantes para as medidas de supressão de fluorescência e tempo de vida de fluorescência foram preparadas utilizando uma faixa de concentração de porfirina de 10-15 μM em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM nos valores de pH apropriados. Os valores de concentrações de porfirina foram determinados a partir dos valores de coeficiente de extinção molar (ϵ) mencionadas anteriormente. Nas amostras de porfirinas foram adicionadas soluções de surfactantes com concentração constante (CTAC 40 mM, HPS 20 mM e 40 mM, SDS 20 mM e 40 mM, e TRITON X-100 20 mM) e as amostras foram incubadas por 24h antes das medidas. Antes de se realizar as medidas de supressão de fluorescência, utilizando como supressor de fluorescência o iodeto de potássio (KI), foi adicionada 10^{-5} M de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$) em todas amostras para se prevenir a produção de I_2 pela oxidação do íon I^- com a formação de I_3^- que é colorido. A concentração da solução estoque de KI foi de 1.6 M e alíquotas (μl) desta solução estoque utilizadas para suprimir a fluorescência foram adicionadas diretamente à solução da cela de medida. Uma nova leitura da intensidade de emissão era realizada após a adição de cada nova alíquota, fornecendo a medida da intensidade de emissão de fluorescência (F) na presença do supressor.

1.3.1.1.3. Preparação das vesículas (LUV- do inglês “Large Unilamellar Vesicles”) de fosfolípidos a partir de palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG).

A preparação de vesículas LUV (do inglês “Large Unilamellar Vesicles”) baseou-se na técnica descrita por Boman *et al.* [52]. A quantidade de lípido(s) pretendida para cada experimento foi solubilizada em clorofórmio espectroscópico e colocada num balão de fundo redondo, rodando o balão de modo a formar um filme lipídico tão fino quanto possível. Para garantir uma evaporação completa do solvente, após eliminação da maior parte do clorofórmio com fluxo de nitrogênio, o balão ficou em vácuo durante 12 hs. A hidratação do filme lipídico foi feita com tampão, procedendo-se em seguida à realização de oito ciclos de congelação/descongelação, com agitação entre estes, utilizando nitrogênio líquido e um banho a 100 °C. Desta forma, buscando-se conseguir o desprendimento total do lípido das paredes do balão, alternamos agitação com aquecimento da suspensão em banho a temperatura superior à transição de fase. No final desta etapa foram obtidas vesículas grandes multilamelares (MLV- do inglês “Multilamellar Large Vesicles”). Finalmente, a solução lipídica foi filtrada por extrusão pela ação da pressão criada por nitrogênio gasoso. Para a extrusão a mistura lipídica foi passada no *extrusor* oito vezes com uma membrana com um poro 0.1µm. Desta forma obteve-se vesículas unilamelares grandes (LUV’S) com um diâmetro de 0.1µm.

1.3.1.1.4. Preparação das amostras de porfirina com vesículas de fosfolípidos

Para realizar os estudos de associação da porfirina com os fosfolípidos, as soluções de porfirina de concentração fixa foram tituladas com uma solução estoque de LUV’s com uma concentração de lípido total de 6 mM. A faixa de concentração utilizada de lípido foi de 0 - 2 mM, deixando a amostra 10 minutos em repouso antes da realização de cada medida. Este tempo foi definido através dos espectros de emissão de fluorescência, onde observamos que após 10 min não ocorreram mudanças espectrais significativas no espectro de emissão da porfirina, sendo assim consideramos que o sistema já havia atingido o equilíbrio. Fizemos também experimentos deixando essas mesmas amostras em equilíbrio por 4 e 24 h em repouso, e observamos que os espectros de emissão não apresentavam mudanças espectrais significativas.

I.3.2. Métodos

I.3.2.1. Espalhamento de Raio-X a baixos ângulos (SAXS)

A análise de SAXS é muito útil na determinação de características estruturais de partículas cujas dimensões variam de dezenas a centenas de ângstrons ($\text{\AA}$). Desta forma, a técnica de SAXS pode ser utilizada em estudos de proteínas em solução, fragmentos de DNA, géis, sistemas micelares e de cristal líquido, etc [53-58]. Todo processo de espalhamento envolve uma relação inversa entre o tamanho de partícula e o ângulo de espalhamento. Este processo de espalhamento pode ser visualizado da seguinte maneira: os elétrons de um sistema ressoam com a frequência do Raio-X que passa por este sistema e emitem ondas secundárias coerentes, que interferem entre si. Supondo uma partícula esférica, pode-se assumir que a onda espalhada de um ângulo de 2θ possua uma diferença de caminho de λ (Figura 04). Sendo assim, se considerarmos o espalhamento de todos os elétrons, a superposição das ondas com todas as fases possíveis conduzirão a um espalhamento na direção 2θ .

Figura 04: Modelo de espalhamento de Raio-X de uma partícula esférica homogênea [59].

A intensidade de espalhamento (I) de uma partícula depende de alguns fatores como a concentração da amostra ou o número de partículas (n) que espalham o raio X, a forma da partícula ($P(q)$) e as posições relativas entre as partículas ($S(q)$).

Esta técnica baseia-se no fato de que em uma solução isotrópica de partículas esféricas ou esferóides de baixa anisometria (razão entre o eixo maior e menor do esferóide) a intensidade do espalhamento de Raio-X a baixo ângulo é dada por:

$$I(q) = k n P(q) S(q) \quad (1)$$

onde n é um fator que depende da densidade de partículas e de efeitos instrumentais, a constante k é a constante de normalização que depende da densidade de partículas e de efeitos instrumentais., $P(q) = \langle F^2(q) \rangle$ é conhecido como fator de forma da partícula espalhadora com $\langle \rangle$ representando uma média sobre todas as possíveis configurações e tamanhos de partículas na dispersão; q é o módulo do vetor de espalhamento com amplitude $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$ e 2θ = ângulo de espalhamento, e $S(q)$ o fator de interferência interpartículas.

Para sistemas não interagentes (diluição infinita), $S(q) \approx 1$, e a intensidade de espalhamento $I(q)$ é simplesmente proporcional a $P(q)$. Neste caso, esta intensidade é expressa pela equação de Guinier [60]:

$$I(q) = n.P(q) = e^{\frac{-q^2 R_g^2}{3}} \quad (2)$$

onde R_g é o raio de giro da partícula. Esta expressão é conhecida como Lei de Guinier e é válida na região de q que satisfaz à condição $q.R_g \leq 1.0$. Numa curva de espalhamento, na região de valores de q baixos ($q \rightarrow 0$), conhecida como a região de Guinier, pode-se obter o raio de giro da partícula através do gráfico de Guinier ($\ln I$ vs q^2) diretamente do coeficiente angular da reta obtida nesta região [60].

A figura 05 apresenta três modelos de espectros de SAXS obtidos para partículas de tamanhos diferentes. Os cálculos dos raios de giro obtidos da região de Guinier mostram que a partícula 1 é menor que a partícula 3, que por sua vez é menor que a partícula 2, portanto, quanto mais deslocado for o espectro para regiões de ângulos menores, maior é o raio de giro da partícula [59].

Figura 05: Modelos de espectros de SAXS para partículas de tamanhos diferentes em função do ângulo de espalhamento, onde $R_{g1} < R_{g3} < R_{g2}$ [59].

Outra informação pode ser obtida da curva de SAXS. A faixa que compreende valores de q maiores, também conhecida como região de Porod, onde a intensidade de espalhamento é independente da forma da partícula e é dominada pelo espalhamento da superfície nesta região. $I(q)$ traz informação sobre a interface entre a partícula e o meio. Se o perfil de densidade eletrônica varia abruptamente na interface, temos a lei de Porod [61] tal que:

$$I(q)_{q \rightarrow \infty} = n P(q) = n (\Delta\rho)^2 2\pi S / q^4 \quad (3)$$

e

$$\pi \lim q^4 I(q) / Q = \frac{S}{V} \quad (4)$$

onde S = superfície total e S/V = superfície específica da partícula [61].

A lei de Porod pode ser generalizada para superfícies fractais do mesmo modo que pode ser modificada se a interface não é abrupta ou se a densidade de espalhamento no interior da partícula não é homogêneo. Uma generalização desta lei pode ser feita para o estudo de SAXS de micelas [61]:

$$\lim \frac{q^4 I(q)}{c_e} = 2\pi \left(\frac{S}{V} \right)_{PAR} \frac{A}{\rho_{PAR}} \left[(\rho_{POL} - \rho_{PAR})^2 + (\rho_{POL} - \rho_0)^2 Y^n \right] \quad (5)$$

$$\text{onde: } \Upsilon = 1 + \frac{[(1 - A)(1 - \rho_0 V_{\text{POL}})]}{A} (\rho_{\text{POL}} - \rho_0) \quad (5a)$$

A - número de elétrons da cadeia parafínica em relação ao número de elétrons da molécula total

(S/V)_{Par} – superfície específica da parte parafínica

ρ_{pol} – densidade eletrônica da região polar

ρ_{par} – densidade eletrônica da região parafínica

ρ_0 – densidade eletrônica do solvente

V_{pol} – volume específico parcial da região polar

c_e – concentração eletrônica

$n = 0$, lamela; $n=1/2$, cilindro; $n=2/3$, esfera.

O índice n está associado a diferentes formas geométricas das partículas espalhadoras.

A função distribuição de distâncias $p(r)$

Como citado anteriormente, para sistemas suficientemente diluídos de objetos monodispersos a intensidade $I(q)$ é relacionada com a forma e tamanho do objeto ($P(q)$) e pode ser descrita por uma transformada de Fourier da função distribuição das distâncias, $p(r)$, da seguinte forma [59]

$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{\text{max}}} p(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dr \quad (6a)$$

e

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(q)(qr) \text{sen}(qr) dq \quad (6b)$$

D_{max} corresponde à dimensão máxima do objeto espalhador de tal forma que $p(r)$ tende a zero para $r \geq D_{\text{max}}$.

A função $p(r)$ carrega a informação sobre a forma do objeto espalhador e do contraste de densidade no interior do mesmo em relação ao meio [62]. A figura 06 mostra alguns exemplos ilustrativos. No caso de esferas, $p(r)$ tem um máximo em torno de $D_{\text{max}}/2$. Para objetos anisométricos, $p(r)$ decai linearmente com a distância entre o tamanho da seção transversal do objeto e sua dimensão máxima [63]. Para objetos de seção transversal constante e de forma

arbitrária, o ponto de inflexão r_1 entre o máximo e a região de decaimento fornece uma estimativa do tamanho da seção transversal [63].

Figura 06: Exemplos de funções de distribuição de distâncias $p(r)$ para partículas com distribuição de densidade eletrônica homogênea e não homogênea [60].

O fator de forma $P(q)$

As três formas mais importantes para este trabalho correspondem à esfera, elipsóide prolato de revolução e o cilindro. Podemos deduzir expressões simples para fatores de forma de partículas com simetria definida.

Esfera

Dada uma esfera de raio R , considerando $\Delta\rho$ constante, a amplitude espalhada é expressa por.

$$P_{esf}(q) = 4\pi\Delta\rho \int_0^R r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (7)$$

onde a integração origina a expressão:

$$P_{esf}(q) = \Delta\rho V \varphi(u) \quad (8)$$

sendo:

$$\varphi(u) = 3[\sin(u) - u \cos(u)]/u^3, \text{ sendo } u = qR \text{ e } V \text{ é o volume da esfera.}$$

Supondo que as esferas sejam constituídas por duas camadas de diferentes densidades eletrônicas, ρ_1 e ρ_2 , em relação ao meio ρ_0 (exemplo na fig. 06), o fator de forma será descrito por [64]:

$$P(q) = F_{esf}^2(q) = [(\rho_1 - \rho_2)V_1 \varphi(qR_1) + (\rho_2 - \rho_0)V_2 \varphi(qR_2)]^2 \quad (9)$$

onde V_1 e V_2 correspondem aos volumes das regiões R_1 e R_2 (Figura 07), respectivamente.

Figura 07: Função distribuição de densidade eletrônica $\rho(r)$ de uma partícula esférica, composta por dois níveis de densidades diferentes ρ_1 e ρ_2 em relação ao meio ρ_0 .

Elipsóide de Revolução

Seja um elipsóide com $\Delta\rho$ constante e semi-eixos R e νR (ν = razão axial, também chamada de anisometria). Este pode ser transformado em uma esfera de volume equivalente cujo raio efetivo R_{ef} é dado por:

$$R_{ef} = R[\cos^2 \psi + \nu^2 \sin^2 \psi]^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

sendo ψ o ângulo formado entre o eixo longo do elipsóide e a direção do vetor de espalhamento.

Para qualquer orientação de um elipsóide, a amplitude será a mesma que a de uma esfera com um determinado raio efetivo R_{ef} (eq. 10). Se o elipsóide não tem orientação preferencial, obtém-se o fator de forma através da média de todos os possíveis valores de ψ , tal que.

$$P(q) = \int_0^{\pi/2} [\Delta\rho V \phi(qR\Theta_1(\psi))]^2 \cos(\psi) d\psi \quad (11)$$

onde $\Theta_1(\psi) = (\cos^2 \psi + v^2 \sin^2 \psi)^{1/2}$.

Utilizando o modelo de duas camadas [64] indicado na Figura 08, analogamente ao caso de esferas (Figura 07), temos:

Figura 08: Representação esquemática de um elipsóide prolato de revolução com dois níveis de densidade eletrônica diferentes ρ_1 e ρ_2 em relação ao meio ρ_0 .

$$P(q) = \int_0^{\pi/2} [(\rho_1 - \rho_2)V_1\phi(qR_1\Theta_1(\psi)) + (\rho_2 - \rho_0)V_2\phi(qR_2\Theta_2(\psi))]^2 \cos(\psi) d\psi \quad (12)$$

onde $\Theta_1(\psi) = (\cos^2 \psi + v^2 \sin^2 \psi)^{1/2}$

$$\Theta_2(\psi) = (\cos^2 \psi + v_{tot}^2 \sin^2 \psi)^{1/2}$$

e $v_{tot} = (vR_1 + \sigma)/R_2$ é a razão axial da partícula inteira, onde $R_2 = R_1 + \sigma$, σ = espessura da segunda camada de densidade eletrônica ρ_2 .

Cilindro

Seja um cilindro de comprimento L e raio da seção transversal R . Considerando $\Delta\rho$ constante e sendo ψ o ângulo formado entre o eixo longo do cilindro e o vetor de espalhamento, temos o fator de forma para uma dada orientação [60].

$$P_{cyl}(q, \psi) = \Delta\rho L \pi R^2 \frac{\text{sen}(q \frac{L}{2} \cos \psi)}{(q \frac{L}{2} \cos \psi)} \frac{2J_1(qR \text{sen} \psi)}{(qR \text{sen} \psi)} \quad (13)$$

onde J_1 é a função de Bessel de 1ª ordem.

Fator de estrutura $S(q)$

A função $S(q)$ para partículas coloidais num meio depende do potencial de interação entre as partículas e de suas posições relativas via a função de distribuição radial $g(r)$ [59,60,62]:

$$\bar{S}(q) = 1 + 4\pi n_p \frac{\langle F(q) \rangle^2}{\langle F^2(q) \rangle} \int_0^\infty (g(r) - 1) r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (14)$$

$\bar{S}(q)$ é o fator de estrutura médio ou a função de interferência entre partículas.

I.3.2.1.1. Métodos de análises dos resultados de SAXS

Os experimentos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, SP) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com λ de radiação 1.608 Å e distância detector-amostra de 731mm. As amostras foram acondicionadas em porta-amostra de 300 µL, com janelas de mica, com feixe de raio-X incidente perpendicular.

Após a aquisição dos dados de SAXS (tempo de aquisição de 15 minutos), várias correções foram necessárias antes que a curva de espalhamento pudesse ser utilizada para o estudo estrutural do sistema em questão. Ainda que a medida tenha sido realizada sob vácuo existe sempre um espalhamento adicional causado pelos elementos ópticos inseridos no caminho do feixe após a amostra (fendas, janelas, soluções tampões, etc.), conhecidos como espalhamento parasita. Assim, denominamos $I_{amostra}$ (Intensidade de espalhamento) a curva de espalhamento da amostra e $I_{parasita}$ a curva do espalhamento parasita, medidas sob as mesmas condições experimentais. A curva de SAXS corrigida é obtida subtraindo-se uma da outra. Porém, $I_{amostra}$ está atenuada pela absorção da amostra, sendo necessário corrigir com relação a esse fator antes da subtração do espalhamento do parasita. Além disso, as curvas $I_{amostra}$ e $I_{parasita}$ não são medidas simultaneamente, e como a intensidade da radiação síncrotron varia com o tempo, a intensidade do feixe primário deve ser monitorada durante a aquisição destas curvas. Cada curva deverá ser normalizada pela respectiva intensidade primária, que denominamos NI_0 . A intensidade NI_0 é integrada durante todo o tempo de aquisição da curva de espalhamento, assim ao normalizarmos por esse fator a curva estará automaticamente normalizada também pelo tempo de aquisição.

Assim, a curva corrigida, a intensidade do feixe incidente, o tempo de aquisição e o espalhamento parasita estão relacionados pela expressão:

$$I_{corrigida} = \frac{I_{amostra} \cdot A_{t_{amostra}}}{NI_{o_{amostra}}} - \frac{I_{parasita} \cdot A_{t_{parasita}}}{NI_{o_{parasita}}} \quad (15)$$

onde:

$A_{t_{amostra}}$ = Atenuação da Amostra (sempre um fator >1)

$A_{t_{parasita}}$ = Atenuação do Parasita (=1 para amostras sem suporte, >1 para suporte de líquidos + solvente, no caso de partículas em solução)

Conforme ilustra a figura 09, a instrumentação da linha de SAXS conta com dois conjuntos espalhadores/fotomultiplicadora. Um deles está localizado antes da amostra e mede a intensidade do feixe incidente N_0 , o outro se localiza após a amostra e mede a intensidade do feixe transmitido N_t . A princípio a atenuação seria dada por N_0/N_t , medidos simultaneamente na presença da amostra. Entretanto, como a eficiência dos detectores de cintilação não é a mesma, devemos determinar a eficiência relativa entre eles. A eficiência relativa E_R é dada pela razão entre o número de contagens medidas por cada detector durante o mesmo período de tempo, na ausência de amostra:

Figura 09: Esquema da instrumentação usada nas medidas de SAXS.

$$E_R = N_0 / N_t \text{ [sem amostra]} \quad (16)$$

A atenuação da amostra é dada por:

$$A_t = (N_0 / N_t \text{ [com amostra]}) / E_R \quad \text{ou ainda} \quad A_t = \frac{\left(\frac{N_o}{N_t} \right)_{\text{com amostra}}}{\left(\frac{N_o}{N_t} \right)_{\text{sem amostra}}} \quad (17)$$

O erro estatístico correspondente é dada por:

$$\frac{\sigma_A}{A} = \sqrt{\frac{1}{N_{0_{\text{amostra}}}} + \frac{1}{N_{t_{\text{amostra}}}} + \frac{1}{N_{0_{\text{semamostra}}}} + \frac{1}{N_{t_{\text{semamostra}}}}} \quad (18)$$

Assim, a correção completa da intensidade será dada por:

$$I_{\text{corrigida}} = \frac{\left(\frac{I_{\text{amostra}} \cdot A_{t_{\text{amostra}}}}{NI_{0_{\text{amostra}}}} - \frac{I_{\text{parasita}} \cdot A_{t_{\text{parasita}}}}{NI_{0_{\text{parasita}}}} \right)}{\text{homogeneidade}} \quad (19)$$

A partir da equação (19) podemos chegar a uma expressão para o erro estatístico. Definindo:

$$I_1 = \frac{I_{\text{amostra}} \cdot A_{t_{\text{amostra}}}}{\text{homog.} NI_{0_{\text{amostra}}}} \quad \text{e} \quad I_2 = \frac{I_{\text{parasita}} \cdot A_{t_{\text{parasita}}}}{\text{homog.} NI_{0_{\text{parasita}}}} \quad \text{temos:}$$

$$\left(\frac{\sigma_1}{I_1} \right)^2 = \frac{1}{I_{\text{amostra}}} + \frac{1}{NI_{0_{\text{amostra}}}} + \left(\frac{\sigma_{A_{\text{amostra}}}}{A_{\text{amostra}}} \right)^2 + \left(\frac{\sigma_{\text{homog}}}{\text{homog}} \right)^2 \quad (20)$$

$$\left(\frac{\sigma_2}{I_2} \right)^2 = \frac{1}{I_{\text{parasita}}} + \frac{1}{NI_{0_{\text{parasita}}}} + \left(\frac{\sigma_{A_{\text{parasita}}}}{A_{\text{parasita}}} \right)^2 + \left(\frac{\sigma_{\text{homog}}}{\text{homog}} \right)^2 \quad (21)$$

$$I_{\text{corrigida}} = I_1 - I_2 \quad \Rightarrow \quad \boxed{\sigma_{\text{corr}} = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}} \quad (22)$$

Os dados corrigidos das curvas de SAXS são então obtidos em função do vetor de espalhamento (q) e também a propagação de erro para cada curva experimental.

Para determinação do ângulo de espalhamento 2θ precisamos conhecer a posição de incidência do feixe direto no detector (que denominamos canal zero, C_z), a distância amostra detector (D) e a distância entre dois canais consecutivos (que chamamos de relação mm/canal, K). O ângulo de espalhamento associado a um canal C será dado por:

$$2\theta = \arctan\left[\frac{(C - C_z)K}{D}\right] \quad (23)$$

D e K devem ser expressos na mesma unidade (em geral utilizamos mm).

Para o ajuste na presença de modelos biomiméticos as amostras estudadas foram: (a) 100 mM de CTAC puro e na presença de 2, 5 e 10 mM de TPPS₄ nos pHs 4 e 9; (b) 40 e 100 mM de SDS puro e na presença de 2, 5 e 10 mM de TMPyP no pH 6.

Como mencionado anteriormente, a intensidade de espalhamento $I(q)$ de uma solução isotrópica de partículas esféricas monodispersas de baixa anisotropia (menor do que 3) é descrita pela equação abaixo [65]:

$$I(q) = knP(q)S(q) \quad (24)$$

onde k é a constante de normalização que depende da densidade de partículas e de efeitos instrumentais. Para sistemas com pequena polidispersividade ($\approx 20\%$), o desvio na equação (24) corresponde ao espalhamento de fundo difuso [65] que foi levado em conta em nossos dados.

$P(q)$ é a média orientacional do fator de forma de partícula e pode ser modelada de acordo com a geometria da partícula. Em nosso caso, as micelas foram modeladas como um elipsóide prolato e/ou cilindro [46,47,57,60]. O semi-eixo menor é o comprimento de uma cadeia parafínica, R_{par} , um parâmetro livre que foi restringido a poder variar ao redor do valor do comprimento da cadeia estendida (16.7 Å para SDS [57,60] e 21.0-24.0 Å para CTAC [44,46]). O semi-eixo maior é vR_{par} , com v igual à razão axial, o segundo parâmetro livre no ajuste. O modelo supõe uma micela composta essencialmente de duas regiões de densidades eletrônicas diferentes: um centro interior parafínico, com densidade eletrônica $\rho_{\text{par}} = 0.275\text{e}/\text{\AA}^3$, e uma região polar externa, cercando o centro hidrofóbico, com uma espessura σ , que inclui as cabeças polares e a água de hidratação, com densidade eletrônica ρ_{pol} (terceiro e quarto parâmetros livres no

ajuste) relativo ao meio contínuo (solução tampão com densidade eletrônica supostamente igual à água de $0.327 \text{ e}/\text{\AA}^3$).

$S(q)$ na equação 24 corresponde à função de interferência interpartículas e pode ser calculada para uma dada carga de superfície micelar (grau de ionização α , outro parâmetro livre). Neste estudo, nós utilizamos a metodologia de Hayter e Penfold [67,68] que associa à micela uma esfera carregada, interagindo por um potencial de Coulomb blindado por meio da aproximação esférica (MSA). Por conseguinte, o modelo micelar usado neste estudo em $P(q)$ e a esfera em $S(q)$ têm volumes parafínicos iguais e são rodeados por uma camada polar de espessura σ [57,60], resultando num raio efetivo da esfera R_{ef} . Os parâmetros estruturais e a carga micelar são então obtidas por ajustes do produto $P(q)S(q)$ à curva experimental [57,60]. Deve ser observado que α deve ser considerado como um "valor efetivo", uma vez que como um parâmetro livre pode suprimir as deficiências das aproximações feitas no potencial de interação.

Na prática, o programa utilizado nos ajustes das curvas de espalhamento das micelas na presença de porfirinas foi desenvolvido no Instituto de Física de São Paulo, considerando os modelos do elipsóide prolato e cilindro, descritos anteriormente. Os parâmetros deste ajuste são a espessura polar (σ_{pol}), o raio parafínico (R_{par}), o coeficiente de ionização (α), a densidade eletrônica da camada polar (ρ_{pol}) e a anisometria (v), e são ajustados manualmente. O arquivo gerado com cada conjunto desses parâmetros é sobreposto ao arquivo de dados experimentais, de forma que a curva teórica gerada seja a mais próxima possível dos pontos experimentais. Este processo, por ser manual, é relativamente demorado, pois esta simulação é feita passo a passo e a mudança de um dos valores de um parâmetro conduz à modificação dos outros, que devem por sua vez ser testados novamente, e otimizados por ajustes sucessivos.

1.3.2.2 Espectroscopia de absorção ótica

Quando a luz incide sobre um meio homogêneo, uma porção da luz incidente (I_0) é refletida e espalhada (I_r), outra é absorvida (I_a) pelo meio e a restante é transmitida (I_t):

$$I_0 = I_r + I_a + I_t \quad (25)$$

O espectro de absorção é usualmente apresentado como absorbância versus comprimento de onda (λ). Dois parâmetros são usados para caracterizar este espectro: a posição do

comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) e sua intensidade. A intensidade é representada pelo coeficiente de absorção molar (ϵ), que é dado pela Lei de Lambert-Beer [69]:

$$A = \log(I_0/I_t) = \epsilon c L \quad (26)$$

Em que A é a absorbância; ϵ é o coeficiente de absorção molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); c é a concentração (M) e L é o caminho ótico (cm). Neste trabalho, os espectros de absorção foram registrados usando o espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu-UV-1601.

1.3.2.3. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência está estreitamente relacionada com a espectroscopia de absorção ótica. Após as moléculas no estado fundamental (S_0) terem absorvido energia radiante, e terem sido excitadas para um estado eletrônico excitado de mais alta energia (S_1), elas perdem o excesso de energia para regressarem ao estado eletrônico fundamental. Este fenômeno pode ocorrer por dissociação ou ionização da molécula, ou pela relaxação através da dissipação de energia na forma de calor (processos não radioativos) ou pela emissão de luz (processo radioativo). A perda de energia através da emissão de luz sem mudança de spin resulta na fluorescência, ao contrário da fosforescência, em que a transição ocorre com mudança de spin [69].

O tempo de vida médio de fluorescência é da ordem de 10^{-7} a 10^{-9} segundos [71]. Este tempo de vida da molécula no estado excitado depende da competição entre a emissão radioativa e outros processos não radioativos de relaxação. Estes processos não radioativos correspondem aos mecanismos alternativos para as moléculas excitadas dissiparem o excesso de energia e retornarem para o estado fundamental resultando na diminuição ou supressão de fluorescência [69,70]. Os processos não radioativos que competem com a fluorescência (k_f) são: conversão interna (k_{ic}), cruzamento intersistemas (k_{is}) e supressão de fluorescência ($k_q[Q]$)

A conversão interna (k_{ic}) descreve processos intermoleculares pelos quais uma molécula passa para um estado eletrônico de mesma multiplicidade sem emissão de radiação geralmente do tipo $S_n^0 \rightarrow S_{n-1}^v$ ou $T_n^0 \rightarrow T_{n-1}^v$, correspondendo à relaxação para o nível vibracional fundamental do estado excitado. A conversão interna ocorre quase instantaneamente (10^{-12} s). Esta relaxação

ocorre por dissipação através dos modos vibracionais internos ou por colisões com as moléculas do solvente.

Um outro processo não radioativo, o cruzamento intersistemas (k_{is}), ocorre com mudança de estado de spin, que é nominalmente proibida, convertendo-se um singlete excitado S_1 em um estado tripleto excitado T_1 . Em seguida, ocorre a relaxação do estado T_1 para o estado singlete fundamental S_0 por fosforescência. Como o estado tripleto possui energia menor que o estado singlete, a fosforescência ocorre em comprimentos de onda maiores do que a fluorescência e possui tempo de vida maior (de μs a ms) devido à proibição por mudança de spin $T_1 \rightarrow S_0$. É interessante mencionar que a presença de espécies paramagnéticas, tal como Fe^{3+} , facilita o cruzamento intersistema e um conseqüente decréscimo na fluorescência [70].

A supressão de fluorescência ($k_q[Q]$), geralmente é o resultado de colisões ou de formação de complexos com solutos moleculares $[Q]$ capazes de reduzir o tempo de vida do estado excitado ou “manter” o complexo fluoróforo-supressor no estado fundamental, provocando a supressão de fluorescência. Este processo será discutido mais adiante.

Uma vez considerados os processos não radioativos que competem com a fluorescência, podemos definir o rendimento quântico da fluorescência (ϕ_F) como sendo a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos [70], ou seja;

$$\phi = \frac{k_F}{k_F + k_{ic} + k_{is} + k_q[Q]} \quad (27)$$

A equação 27 mostra que se todos os processos não radioativos não existissem ou fossem infinitamente desprezíveis, a fluorescência seria o único mecanismo de relaxação, ou seja, $\phi_F = 1$. Sendo assim, normalmente as espécies químicas fluorescentes apresentam ϕ_F menor do que 1.

O espectro de emissão de fluorescência deve ser independente do comprimento de onda da excitação e deve apresentar-se como uma imagem especular do espectro de absorção. Isso ocorre pois, toda a fluorescência observada é normalmente originária da transição $S_1^0 \rightarrow S_0^v$, enquanto a absorção ocorre desde o estado S_0^0 para S_1^v . Todavia, o espectro de emissão aparece deslocado para comprimentos de onda maiores (energia menores) que a banda de absorção. Este deslocamento é conhecido como deslocamento de Stokes e é observado para moléculas

fluorescentes em solução, devido ao fato de que a molécula no estado excitado interage com o solvente no qual está inserida, levando a uma diminuição de energia do estado excitado, o qual será tanto maior quanto maior for a interação com o solvente.

1.3.2.4. Supressão de Fluorescência

A presença de alguns tipos de moléculas, chamadas supressores, surge como mais um canal de perda de energia do estado excitado. Esse efeito se chama supressão. Existem dois tipos de supressão: estática e dinâmica.

A supressão colisional ou dinâmica é aquela que ocorre devido às colisões entre a molécula excitada e os supressores. Neste caso, o supressor precisa colidir com a molécula durante o tempo de vida do estado excitado (é um processo dependente do tempo). Após o contato, a molécula retorna ao estado fundamental. A supressão estática ocorre devido a formação de complexos fluoróforo-supressor. Os dois tipos de supressão requerem um contato entre o fluoróforo e o supressor, e conseqüentemente, fornecem informações importantes sobre o fluoróforo.

A supressão colisional é descrita pela equação de Stern-Volmer [70]:

$$\frac{F_o}{F} = 1 + k_q \tau_o [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (28)$$

onde F_o e F são, respectivamente, as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, k_q a constante bimolecular de supressão, τ_o o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado na ausência de supressor, $[Q]$ a concentração do supressor e a constante de Stern-Volmer (K_{SV}). Se a supressão é dinâmica, a constante de Stern-Volmer pode ser representada por K_D .

A constante de Stern-Volmer pode ser obtida diretamente do gráfico F_o / F em função de $[Q]$. Em geral este gráfico é linear, indicando que os fluoróforos presentes em solução são igualmente acessíveis ao supressor. O coeficiente angular da reta é atribuído ao valor da constante de Stern-Volmer (K_{SV}). Se houver mais de uma classe de fluoróforo, com diferentes acessibilidades ao supressor, então o gráfico será não linear [70]. É importante mencionar que a linearidade do gráfico de Stern-Volmer não prova que ocorre apenas supressão colisional. Alguns casos de supressão estática podem resultar em gráficos de Stern-Volmer lineares. Para observar

experimentalmente a existência de supressão estática é necessária uma maior concentração de supressor e o desvio observado no gráfico de Stern-Volmer pode ser negativo ou positivo [70]. Desvios negativos são associados à heterogeneidade de fluoróforos enquanto que desvios positivos devem-se à supressão estática.

A supressão estática e/ou colisional pode ser distinguida através de mudanças de temperatura e viscosidade, ou preferencialmente por medidas de tempo de vida de fluorescência. Altas temperaturas resultam numa maior difusão de fluoróforo e supressor e maior supressão colisional. Altas temperaturas podem resultar na dissociação de complexos ligados fracamente, levando a uma menor supressão estática.

A medida de tempo de vida de fluorescência é o método mais efetivo para distinguir supressão estática e dinâmica. Para supressão estática $\tau_o/\tau=1$, ao contrário da supressão dinâmica, onde $\tau_o/\tau=F_o/F$. É importante mencionar que a presença simultânea de supressão estática e dinâmica leva ao desvio da linearidade do gráfico de Stern-Volmer. Neste caso, a equação (28) deve ser modificada levando em conta os dois modos de supressão de acordo com a equação quadrática:

$$\frac{F_o}{F} = (1 + K_D[Q]) \times (1 + K_S[Q]) = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (29)$$

1.3.2.5. Medidas de Fluorescência

As medidas de fluorescência da TMPyP e TPPS₄ na presença de diferentes concentrações de surfactantes e fosfolípeos, foram realizadas em uma cubeta de caminho ótico 0.5 cm excitando-se as amostras em um determinado comprimento de onda na região das bandas Q, tomando-se o cuidado para não ter uma absorbância, neste comprimento de onda, superior a 0.1, para evitar o efeito de filtro interno. A integral de emissão de fluorescência foi monitorada na região de 600 - 750 nm. Os espectros de emissão foram corrigidos pela diluição e subtraindo o espectro de emissão do branco. Principalmente, para os experimentos com os fosfolípeos, onde podemos ter uma contribuição do espalhamento dos fosfolípeos nos espectros de emissão.

Os experimentos de supressão de fluorescência da porfirina TMPyP foram realizados a valores de pH 2, 6, e 9 em solução tampão e apenas no pH 6 na presença de micelas e fosfolípeos. Os experimentos com a TPPS₄ foram realizados nos pH 2, 3 e 7.5 em solução

tampão e na presença de micelas e fosfolípidos. A excitação do fluoróforo foi feita no comprimento de onda apropriado, e a intensidade de emissão de fluorescência inicial (F_0) foi então registrada. Com o auxílio de uma pipeta automática (da Gilson) uma alíquota da solução estoque de KI foi adicionada à solução da cela. Uma nova leitura da intensidade de emissão foi realizada após a adição de cada nova alíquota fornecendo a medida da intensidade de emissão de fluorescência (F) na presença do supressor. Em todos os experimentos foram controladas as temperaturas, utilizando um termômetro com termopar diretamente mergulhado na amostra, para se ter o controle exato da temperatura. O comprimento de onda de excitação foi 515 nm para a TMPyP e 590 e 525 nm para TPPS₄ em valores de pH ácido e básico, respectivamente.

Os dados de supressão foram corrigidos pela diluição devido à adição do supressor KI, e em seguida foram ajustados através do gráfico de Sten-Volmer e da equação quadrática (equação 29) [70].

Todos os dados experimentais apresentados de absorção ótica, espalhamento de luz e fluorescência, são uma média de vários experimentos realizados independentemente (pelo menos três).

1.3.2.6. Tempo de vida de fluorescência – Fluorometria no domínio da frequência

Como mencionado anteriormente, a fluorescência tem sido usada para estudar vários sistemas químicos, físicos e biológicos. Apesar da grande quantidade de informações que se consegue com medidas de fluorescência estática, é interessante examinar também a fluorescência resolvida no tempo. Com esta técnica pode-se obter o tempo que a molécula permanece no estado excitado, ou seja, seu tempo de vida. Com isto é possível verificar se uma amostra contém vários fluoróforos distintos, pois neste caso o que se espera é mais de um tempo de vida. No caso de um único tipo de fluoróforo, os dados de fluorescência resolvida no tempo podem indicar se este fluoróforo está presente em um ou mais ambientes distintos (já que o tempo de vida é sensível ao ambiente que circunda o fluoróforo).

Há duas técnicas para se obter dados de fluorescência resolvida no tempo. Na primeira, uma amostra é excitada com um pulso de luz e observa-se a o decaimento de fluorescência em função do tempo. Na segunda técnica, a amostra é excitada com luz modulada e a fluorescência

em função do tempo é obtida da resposta em frequência da emissão. Nos dois casos o objetivo é obter os parâmetros que descrevem a fluorescência em função do tempo.

O modelo mais comum para representar a fluorescência de uma amostra com várias espécies de cromóforos é o modelo multi-exponencial que considera a intensidade da fluorescência em função do tempo como uma soma de exponenciais.

Na espectroscopia de fluorescência no domínio da frequência, a amostra é excitada com luz modulada com frequência angular ω ($\omega=2\pi f$, sendo f a frequência de modulação da luz) muito maior em relação ao inverso dos tempos de vida de emissão. Como consequência, a radiação emitida terá a intensidade modulada na mesma frequência. Entretanto, a emissão exibirá atrasos no tempo e mudanças de amplitude, os quais são determinados pela lei do decaimento da intensidade de emissão da amostra. O atraso do tempo (ϕ_ω) é medido como sendo o deslocamento do ângulo de fase entre a excitação e a emissão. Outra medida independente do tempo de vida é a razão da altura dos picos de emissão em relação aos picos de excitação (m_ω). O fluorímetro utilizado em nossos experimentos no domínio da frequência é da ISS K2TM (Illinois, EUA) e localiza-se no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS – Campinas). Este equipamento utiliza como fonte de luz, um feixe de radiação síncroton. A operação é similar à dos espectrofluorímetros que utilizam outras fontes de luz como laser ou LED (do inglês, “light-emitting diodes”). Este espectrofluorímetro permitiu obter os ângulos de fase e as razões de modulação para uma faixa de frequência de modulação de 3,22 a 476,06 MHz. Esta é uma faixa típica para medidas de tempo de vida em torno de 10 ns. Para cada frequência de modulação (ω), o atrasos da fase (ϕ_ω) e a razão da modulação (m_ω) da amostra foram medidas em relação a uma solução espalhadora. Assim, para um simples decaimento exponencial, o tempo de vida é dado por,

$$\tan \phi_\omega = \omega\tau \quad (30)$$

e

$$m_\omega = (1 + \omega^2 \tau^2)^{-1/2} \quad (31)$$

Através de uma análise assintótica das equações apresentadas acima, é possível notar que para altas frequências de modulação o ângulo de fase de emissão aumenta, ao passo que a modulação diminui.

1.3.2.7. Espalhamento de luz Ressonante

A técnica de espalhamento de luz do mesmo modo que a de absorção ótica está baseada na interação das moléculas com a radiação eletromagnética. Moléculas polarizáveis irradiadas por luz de um comprimento de onda distante de qualquer faixa de absorção interagem com a radiação que pode ser descrita como um campo eletromagnético variando senoidalmente, criando uma polarização que depende da distribuição eletrônica da molécula. Isso produz uma oscilação senoidal dos elétrons dentro da molécula. Estas cargas oscilantes farão com que cada molécula atue como uma pequena antena, dispersando uma parte da energia em direções diferentes daquela da radiação incidente. Essa é à base de todos os fenômenos de espalhamento, em particular de espalhamento de luz [15].

Nas aplicações biológicas, a técnica de espalhamento de luz tem sido utilizada para se obter informações sobre a forma e movimento de macromoléculas e células em solução e sobre o fenômeno de agregação e auto-agregação de cromóforos [72].

Pasternack e Collins [72] apresentaram diversos exemplos de aplicações em estudos com porfirinas utilizando esta técnica. Entre elas, o estudo do arranjo de cromóforos [72] e das interações de porfirinas com DNA devido à existência de agregados envolvendo várias moléculas de porfirina. Foi mostrado que há uma intensificação de várias ordens de grandeza da luz espalhada pela porfirina na presença do DNA. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que as porfirinas meso-tetrakis(N-metil-4-piridil) na forma livre e complexadas com Mn(III) e Fe(III) também formam agregados devido à interação com DNA apresentando uma intensificação da luz espalhada [23,24].

Recentemente foi demonstrado que a espectroscopia de espalhamento de luz ressonante (do inglês “resonant light scattering” - RLS) é uma técnica extremamente sensível e seletiva para a detecção de grandes agregados de cromóforos que interagem eletronicamente [73]. Pasternack e colaboradores [72,73] têm mostrado exemplos de grandes aumentos no sinal de espalhamento na região espectral onde ocorre a absorção das espécies agregadas. Quando os cromóforos são monômeros ou pequenos agregados (por exemplo, dímeros ou trímeros) os espectros experimentais de RLS apresentam um mínimo local devido à “perda de fótons” via absorção, superpondo-se a qualquer sinal de espalhamento. O efeito de RLS consiste em um aumento

considerável na intensidade da luz espalhada em comprimento de onda, onde as espécies agregadas têm uma transição de absorção eletrônica.

I.3.2.7.1. Princípios básicos

A idéia teórica necessária para a compreensão de espalhamento de luz ressonante de agregados pode tomar duas formas. Os agregados podem ser vistos como um conjunto de moléculas polarizáveis ou como uma partícula com um índice de refração diferente do índice de refração do meio.

A extensão com que uma partícula absorve ou espalha luz depende do seu tamanho, forma e do índice de refração do meio. O espalhamento causado por partículas esféricas muito menores do que o comprimento de onda da radiação incidente é conhecido como espalhamento de Rayleigh. Dessa forma, podemos prever que a intensidade de luz espalhada de uma solução na ausência de absorção ótica depende do comprimento de onda como:

$$I \sim 1/\lambda^4 \text{ (Lei de Rayleigh)} \quad (32)$$

As soluções de tampão na ausência de porfirina não absorvem na região espectral estudada. Entretanto, os espectros de espalhamento de luz (RLS) do tampão puro e também os das soluções de surfactantes diferem da lei de Rayleigh, devido à dependência da sensibilidade do espectrofluorímetro com o λ . Como o espalhamento real do tampão puro deve ser descrito pela lei de Rayleigh, pode-se calcular a função sensibilidade do espectrofluorímetro (K) como:

$$K = I_p / R \quad (33)$$

onde R é o espectro de Rayleigh normalizado para unidade, I_p é o espectro de espalhamento medido do tampão puro. Usando K , tem-se todos os espectros medidos (I_{exp}) recalculados como:

$$I_{exp} = I_{medido} / K \quad (34)$$

resultando nas curvas de espalhamento corrigidas [74].

Na região espectral onde as partículas absorvem, dois tipos de fenômenos induzem desvios da lei de Rayleigh. O primeiro é referente à diminuição na intensidade de espalhamento de luz devido a absorção da luz de excitação e da luz espalhada. Este efeito pode ser considerado como [72,74]:

$$I_{EL}^{abs} = I_{EL} \left[\frac{(1 - 10^{-A})}{(A \ln 10)} \right]^2 \quad (35)$$

Onde I_{EL}^{abs} é a intensidade de luz espalhada da solução que tem a absorbância A e I_{EL} é a intensidade de luz espalhada da solução com o mesmo espalhamento de luz mas sem absorção.

O segundo fenômeno que induz desvios da lei de Rayleigh é o aumento da intensidade de espalhamento de luz devido ao aumento no índice de refração da solução na região onde temos absorção ótica (o efeito de ressonância de espalhamento de luz - RLS). Geralmente, este aumento é mascarado pela absorção. Entretanto, quando os agregados são formados este efeito pode ser fortemente acentuado uma vez que a intensidade de RLS é proporcional ao quadrado do volume das partículas dispersantes [72,74].

1.3.2.7.2. Medidas de Espalhamento de luz Ressonante

As amostras preparadas para se fazer as medidas de absorção ótica para o estudo da interação das porfirinas com micelas mistas são as mesmas utilizadas no experimento de RLS. Foram medidos os espectros dos tampões puros, da porfirina pura, e das diferentes soluções de porfirinas/surfactante, com concentrações de surfactantes que variaram de 5 μ M a 20 mM. As leituras das medidas foram realizadas, depois que a solução não apresentasse a presença de bolhas de ar ou de surfactante. Isto requer, em geral, uma espera de 10-15 min após colocar a cubeta com a amostra no fluorímetro.

A intensidade de espalhamento de luz foi monitorada usando-se uma geometria de 90° no fluorímetro através da varredura simultânea dos monocromadores de excitação e de emissão na região de 350 até 650 nm. Os espectros de espalhamento de luz foram corrigidos usando-se a função sensibilidade do espectrofluorímetro (K), bem como o espectro de absorção da amostra através da equação 35 [16,72,74].

1.4. Resultados e Discussões

1.4.1. Interação das porfirinas aquo-solúveis TMPyP e TPPS₄ com micelas de SDS e CTAC investigada por espalhamento de Raio -X a baixo ângulo (SAXS).

1.4.1.1. Interação da porfirina TPPS₄ com micelas de CTAC

1.4.1.1.1. Micelas puras de CTAC

A porfirina TPPS₄ em concentrações micromolares apresenta um valor de pK_a ao redor de 4.8 em solução aquosa [16]. Abaixo deste valor de pK_a temos a porfirina protonada e acima deste valor temos a porfirina não protonada. Já na presença de micelas de CTAC este valor de pK_a desloca para 2.5. Estes valores foram determinados por espectroscopia de absorção ótica [16]. A TPPS₄ em solução aquosa ácida, na faixa de concentração de 2-10 mM forma auto-agregados, os quais foram estudados recentemente por nosso grupo, utilizando a técnica de SAXS [75]. Por outro lado, para concentrações de porfirina na faixa de 2-10 mM na presença de micelas de CTAC, estes agregados são solubilizados e o pK_a da porfirina nestas altas concentrações não é precisamente conhecido. Os experimentos de SAXS descritos a seguir das micelas de CTAC na presença de porfirina foram realizados em pH 4.0 e 9.0. Porém, não podemos afirmar concretamente que na concentração de 10 mM de TPPS₄ e na presença de 100 mM de CTAC, no pH 9.0, a porfirina se encontra na sua forma neutra, enquanto que em pH 4.0, a porfirina está parcialmente protonada. Assim, experimentos de absorção ótica foram realizados para as amostras de porfirina 10 mM em pH 4.0 e 9.0, na presença e na ausência de 100 mM de CTAC (Figura 10). Estes dados mostram que a porfirina em solução aquosa pura em pH 4.0, forma J-agregados com um espectro de absorção bastante característico, apresentando picos em 490 e 710 nm, o que está de acordo com os nossos dados descritos na literatura [75]. A adição de surfactante levou à solubilização dos auto-agregados, mostrando um espectro bastante característico para a porfirina monomérica ligada às micelas. Entretanto, em pH 9.0, o espectro de absorção da porfirina corresponde à espécie monomérica neutra [16,75]. A adição de CTAC no pH 9.0 apresenta um espectro similar ao observado para o sistema TPPS₄-CTAC em pH 4.0. Possivelmente, o valor do pK_a para esta porfirina na presença de CTAC nas condições dos nossos

experimentos, é menor do que o valor de 2.5 encontrado anteriormente para concentrações de porfirina micromolar.

Figura 10: Espectro de absorção ótica para 10 mM de TPPS₄ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 4.0 e 9.0, na ausência e na presença de 100 mM de CTAC. O caminho ótico utilizado foi de 4.5 μm .

A figura 11 mostra os dados de SAXS obtidos das micelas de 100 mM CTAC, pH 4.0, na ausência e na presença da porfirina aniônica TPPS₄, sendo a faixa de concentração de TPPS₄ de 0-10 mM. Inicialmente, as medidas de SAXS foram realizadas com concentração de surfactante (CTAC) menores, 40 mM. Entretanto, a intensidade de espalhamento não foi o suficiente para se realizar os ajustes adequadamente. As linhas em preto correspondem ao melhor ajuste das curvas experimentais (eq. 1), assumindo que a forma das micelas de CTAC é um elipsóide prolato, com uma razão axial de $\nu = 3.0$ (Tabela 1). As curvas de espalhamento para as micelas puras de CTAC nos valores de pH 4.0 e 9.0 são muito similares, como podemos observar nas figuras 11 e 12, bem como nos parâmetros dos ajustes encontrados na Tabela 1. A curva de SAXS da solução micelar de 100 mM de CTAC apresentou um pico bem definido em $q=0.06 \text{ \AA}^{-1}$, o que está de acordo com a literatura [76,77]. Este pico indica uma forte interação repulsiva entre as micelas de

CTAC. A função $S(q)$, fator de estrutura intermicelar, contribui de forma significativa para este pico (Figuras 11B e 12B), pois está associado à interação eletrostática repulsiva entre micelas carregadas [57,65,78]. Em estudos anteriores [57], um comportamento similar foi observado nas curvas de SAXS para as micelas puras de SDS 40 mM no pH 4.0, onde aparece um pico em $q=0.04 \text{ \AA}^{-1}$. Já para as micelas de HPS e LPC 30 mM, na ausência de drogas [79,80], as curvas de SAXS foram ajustadas considerando que $S(q)=1$ na equação (1), consistente com a carga líquida nula das micelas zwitteriônicas. Por outro lado, ambos os surfactantes SDS (aniônico) e HPS (zwitteriônico) apresentam um segundo pico bem definido com intensidade máxima em $q = 0.17$ e $0.12 \text{ \AA}^{-1}$, respectivamente, o qual é característico do fator de forma intramicelar $P(q)$ [57,65,78]. No caso das micelas puras de CTAC, o segundo pico não fica claro nas curvas de SAXS (Figuras 11A e 12A). Entretanto, a adição de TPPS₄ modifica significativamente as curvas de SAXS, como descrito a seguir.

1.4.1.1.2. Efeito da porfirina TPPS₄ nas micelas de CTAC

Através dos ajustes teóricos apresentados nas figuras 11 e 12, fica claro que o pico característico em $q=0.06 \text{ \AA}^{-1}$ não é apenas característica da função $S(q)$, sendo bastante influenciado pela forma da micela, $P(q)$ (Figura 11B e 12B), principalmente, pela contribuição da diminuição do raio parafínico (R_{par}), com o aumento da concentração de porfirina. A adição de porfirina diminuiu o raio parafínico da micela, dando uma forte evidência de que o centro hidrofóbico da micela pode ser afetado pela incorporação da porfirina. Entretanto, em nossos resultados não fica claro se a função interferência ($S(q)$) é alterada pela adição de porfirinas (figuras 11B e 12B) e o coeficiente de ionização diminui o seu valor menos de 10% após a adição de porfirina, como podemos observar na Tabela 1. Seria esperado que a interação da porfirina aniônica TPPS₄ com o surfactante catiônico CTAC fosse favorecer uma “blindagem” da cabeça polar da micela de CTAC, diminuindo a função interferência interpartículas. Este efeito de blindagem fica mais evidente estimando a carga efetiva da superfície das micelas, $z = \alpha n$, a qual no pH 4.0 (Tabela 1), reduz de 15.5 na ausência de porfirina para 8.3 em 10 mM de TPPS₄. A tendência de z (e α) decrescer é consistente com a carga parcial da superfície neutralizada pela porfirina. Por outro lado, a função $P(q)$ exibe uma considerável mudança em função da concentração de porfirina (Figura 11B e 12B).

O pico característico da micela desloca para valores maiores de q pelo aumento da concentração de TPPS₄. Esta mudança evidencia que o centro hidrofóbico micelar é afetado pela incorporação da porfirina e é independente do pH do meio e do estado de protonação da TPPS₄. Os experimentos de SAXS foram realizados nos valores de pH 4.0 e 9.0 para podermos comparar a diferença entre os estados de protonação da porfirina TPPS₄, $H_2TPPS_4^{4-} + 2H^+ \rightleftharpoons H_4TPPS_4^{2-}$, sendo que o valor de pK_a em tampão é de 4.52 [16]. Em estudos anteriores, verificamos que a interação da TPPS₄ com o surfactante CTAC deve-se tanto à contribuições hidrofóbicas como pela interação eletrostática da porfirina com a cabeça polar do surfactante de carga oposta [16].

Na Tabela I estão apresentados os parâmetros dos ajustes, obtidos das análises das curvas de SAXS, os quais são bastante similares para ambos os valores de pH, refletindo a similaridade entre as curvas de SAXS (Figura 11B e 12B). Todas as curvas de SAXS foram modeladas como elipsóide prolato. O valor encontrado para o R_{par} da micela de CTAC em tampão ($R_{par} = 23.0 \pm 0.4$ Å) está de acordo com estudos anteriores da literatura [76,77,81] e com o valor esperado do comprimento da cadeia parafínica estendida [44]. Como dito anteriormente, a adição de porfirina à micela de CTAC, diminui o valor do R_{par} (o valor do R_{par} com 10 mM de TPPS₄ é 20.0 ± 0.5 Å). Os parâmetros encontrados para a espessura da camada polar $\sigma_{pol} = 3.9 \pm 0.3$ Å, a densidade eletrônica (0.39 ± 0.01 e/Å³) e a anisometria ($v = 3.1 \pm 0.1$) são praticamente inalterados com o aumento da concentração de porfirina.

Figura 11: (A) Curvas de SAXS para micelas de CTAC 100 mM na ausência e na presença de TPPS₄, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 4.0. As linhas contínuas correspondem aos produtos $P(q) \cdot S(q)$ obtidos dos ajustes usando como modelo o elipsóide prolato (eq. 01). (B) Função interferência inter-partículas, $S(q)$, e função de forma da partícula, $P(q)$, obtidas dos ajustes apresentados na figura 11A.

Figura 12: (A) Curvas de SAXS para micelas de CTAC 100 mM na ausência e na presença de TPPS₄, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 9.0. As linhas contínuas correspondem aos produtos $P(q) \cdot S(q)$ obtidos dos ajustes usando como modelo o elipsóide prolato (eq. 01). (B) Função interferência inter-partículas, $S(q)$, e função de forma da partícula, $P(q)$, obtidas dos ajustes apresentados na figura 12A.

Tabela 1: Valores dos parâmetros de ajuste das curvas de SAXS para 100 mM de CTAC na presença e na ausência de TPPS₄ nas concentrações indicadas, nos valores de pH 4.0 e 9.0, obtidos através da modelagem de $P(q)$ e $S(q)$.

pH 4.0							
$[TPPS_4] \text{ (mM)}$	α	$R_{par} \text{ (Å)}$	$\sigma_{pol} \text{ (Å)}$	$\rho_{pol} \text{ (e/Å}^3\text{)}$	v	$V \times 10^{-3} \text{ (Å}^3\text{)}$	n
0	0.045(5)	23.0(4)	3.9(3)	0.38(1)	3.1(1)	158(13)	344(28)
2	0.040(3)	23.0(5)	3.9(3)	0.39(1)	3.0(2)	153(20)	333(44)
5	0.038(3)	21.5(5)	4.0(3)	0.39(1)	3.0(2)	125(17)	272(37)
10	0.038(3)	20.0(5)	4.0(2)	0.40(1)	3.0(1)	100(11)	219(24)
pH 9.0							
$[TPPS_4] \text{ (mM)}$	α	$R_{par} \text{ (Å)}$	$\sigma_{pol} \text{ (Å)}$	$\rho_{pol} \text{ (e/Å}^3\text{)}$	v	$V \times 10^{-3} \text{ (Å}^3\text{)}$	n
0	0.045(5)	23.0(3)	3.6(2)	0.39(1)	3.0(2)	153(16)	333(35)
2	0.043(3)	22.5(5)	3.8(3)	0.39(1)	3.0(2)	143(19)	312(41)
5	0.040(3)	21.5(5)	3.9(2)	0.402(3)	3.1(2)	129(17)	281(37)
10	0.040(3)	20.0(5)	3.9(1)	0.405(2)	3.1(2)	104(15)	226(33)

R_{par} = menor eixo parafínico, σ = espessura da camada polar, ρ_{pol} = densidade eletrônica da camada polar, v = razão axial entre os eixos maior e menor (parte parafínica), α = coeficiente de ionização, n = número de agregação micelar, V = volume da parte parafínica da micela. Foi utilizado o modelo elipsóide prolato para $P(q)$. Os números em parênteses correspondem aos erros dos ajustes associados ao último algarismo significativo.

Assim, a única alteração nítida nos parâmetros de ajustes das micelas de CTAC na presença de porfirina foi no valor de R_{par} da micela, além de uma pequena modificação na camada polar. Estas alterações são certamente devido a diferentes contribuições de interação, ou seja, contribuições hidrofóbicas e eletrostáticas no processo de formação do complexo agregado surfactante-porfirina. Entretanto, para confirmarmos que a diminuição no R_{par} poderia modificar a curva de espalhamento fizemos uma simulação onde não consideramos a norma (ou seja, a constante k na eq. (1)), deixando este parâmetro livre e fazendo apenas um estudo sistemático, ou seja, não multiplicamos o ajuste pela norma. Para tanto, os outros parâmetros foram testados em intervalos pré-escolhidos, um de cada vez, mantendo os demais parâmetros fixos. As figuras 13,

14 e 15 apresentam os resultados destes testes, onde apenas um dos parâmetros variou na faixa estabelecida, sendo que os demais parâmetros permaneceram fixos.

Como podemos observar na figura 13, o único parâmetro a ser modificado na simulação de ajuste foi a anisometria (razão axial). Consideramos como parâmetros fixos $\alpha=0.04$; $R_{\text{par}}=22.0$ Å; $\sigma_{\text{pol}}=4.0$ Å (os parâmetros fixos estão apresentados nas legendas das figuras); os resultados obtidos da simulação não são próximos das curvas experimentais, não podendo ser considerados satisfatórios. É importante mencionar que a faixa de variação escolhida da razão axial, v , é muito maior quando comparada com os erros estimados dos parâmetros de ajuste. Entretanto, a variação da densidade eletrônica polar (ρ_{pol}), produz alterações na forma das curvas de SAXS (Figura 14), que pode ser associada à diminuição de espalhamento. Baseando-se nessas simulações, é possível concluir que variações em ambos os parâmetros v e ρ_{pol} , não reproduzem as curvas de SAXS experimentais satisfatoriamente. Vale salientar que fizemos o mesmo tipo de ajuste variando apenas a espessura da camada polar, e variando simultaneamente a razão axial e a espessura da camada polar, entretanto não observamos uma boa reprodução das curvas de SAXS experimentais. Baseando-se nestes fatos observamos que modificando apenas o raio parafínico, e deixando os demais parâmetros com valores fixos (apresentados na legenda da Figura 15), ocorre uma mudança drástica na forma ($P(q)$) da curva de espalhamento, simulando o comportamento das curvas de espalhamento experimentais (Figura 11A e 12A). Nas figuras 13B e 14B fica nítido, através da simulação, que a intensidade de espalhamento obtida ($I(q)$), ou seja, o produto $S(q).P(q)$, não sofre mudanças drásticas na forma da micela.

Figura 13: (A) Curvas de SAXS simuladas pelo produto $P(q).S(q)$, considerando como parâmetros fixos os valores estipulados na figura 3A variando apenas a anisometria (v). (B) Inseto da região de valores de q entre $0.2 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$. Os demais parâmetros foram fixados em: $\sigma_{\text{pol}} = 4.0 \text{ \AA}$, $\rho_{\text{pol}} = 0.4 \text{ e/ \AA}^3$, $\alpha = 0.04$, e $v = 3.0$.

Figura 14: (A) Curvas de SAXS simuladas pelo produto $P(q).S(q)$, considerando como parâmetros fixos os valores estipulados na figura 4A variando apenas a densidade eletrônica polar (ρ_{pol}). (B) Inserto da região de valores de q entre $0.2 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$. Os demais parâmetros foram fixados em: $\sigma_{pol} = 4.0 \text{ \AA}$, $\rho_{pol} = 0.4 \text{ e/ \AA}^3$, $\alpha = 0.04$, e $v = 3.0$.

Figura 15: (A) Curvas de SAXS simuladas pelo produto $P(q).S(q)$, considerando como parâmetros fixos os valores estipulados na figura 5A variando apenas o raio parafínico (R_{par}). (B) Inserto da região de valores de q entre $0.15 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$. Os demais parâmetros foram fixados em: $\sigma_{pol} = 4.0 \text{ \AA}$, $\rho_{pol} = 0.4 \text{ e/ \AA}^3$, $\alpha = 0.04$, e $v = 3.0$.

Em dois trabalhos anteriores em nosso grupo envolvendo estudos da micela zwitteriônica de HPS com os derivados fenotiazínicos (TFP e CPZ) [66] e com as porfirinas aniônicas [79] foram observados resultados correlatos. No caso dos fenotiazínicos, a adição de TFP e CPZ nas micelas de HPS, não mudou a forma das micelas que foram descritas como pequenos elipsóides prolato, sendo que o raio parafínico diminuiu com a adição de TFP e CPZ. Este efeito foi justificado pela interação complexa das drogas TFP e CPZ com o dipolo elétrico do surfactante na interface da micela de HPS. A forte interação hidrofóbica e eletrostática levou a uma redução do tamanho da micela. Para o sistema porfirina aniônica com micelas de HPS foi observado através dos dados de SAXS que a adição de porfirina (TPPS₄, ZnTPPS₄ e FeTPPS₄) nas micelas de HPS reduziu a forma prolata com razão axial de 1.8 ± 0.2 (na ausência de porfirina) para 1.5 ± 0.1 (na presença de porfirina. Este efeito foi acompanhado pela diminuição do raio parafínico de 22.5 ± 0.5 para 18.0 ± 0.2 Å. Estes resultados mostram que o centro hidrofóbico micelar é afetado pela incorporação de porfirina, independente do tipo de porfirina (metaloporfirina ou porfirina base livre) e pH.

1.4.1.1.3. Estruturas das micelas de CTAC quando comparada com dados da literatura

Nossos resultados mostraram que o valor do raio parafínico na ausência de porfirina ($R_{\text{par}} = 23.0 \pm 0.4$ Å) está de acordo com dados reportados na literatura [67,77,76,81] e com o comprimento esperado da cadeia hidrocarbônica do CTAC de acordo com a fórmula de Tanford [44]. Como observado das análises das curvas de SAXS, a adição de porfirina induz um rearranjo no centro hidrofóbico das micelas catiônicas. Este efeito torna-se maior com o aumento da concentração de porfirina, onde o R_{par} é reduzido para 20.0 ± 0.5 Å, indicando um maior empacotamento do centro hidrofóbico quando comparada com as micelas puras de CTAC. Entretanto, os parâmetros relacionados com a espessura da camada polar (σ_{pol}) e a densidade eletrônica polar (ρ_{pol}) são praticamente inalterados nesta faixa de concentração de porfirina estudada.

Aswal e Goyal [77] estudaram através da técnica de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS) a influência de contra-íons no crescimento de micelas iônicas de CTAC e SDS em solução aquosa. A curva de SANS obtida para a micela pura de CTAC 0.1 M, é bastante similar a nossa curva de SAXS obtida para a micela de CTAC 0.1 M em tampão acetato-fosfato-

borato 30 mM nos pHs 4.0 e 9.0 (Figuras 11 e 12). A curva de SANS da micela de CTAC em solução aquosa pura foi modelada como um elipsóide prolato de razão axial 1.6, com dimensões $a=34.7\text{ \AA}$ (semi-eixo maior) e $b=21.5\text{ \AA}$ (semi-eixo menor). É importante mencionar que as curvas de SANS obtidas para micelas catiônicas são bastante similares às curvas de SAXS apresentadas nas figuras 11A e 12A em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM em pH 4.0 e 9.0. O número de agregação encontrado [77] foi de 120 e o coeficiente de ionização foi de 0.13. Já para a micela de CTAC 100 mM, na presença de 100 mM KBr uma anisometria de 3.05 foi obtida com dimensões $a=21.5\text{ \AA}$ e $b=65.6\text{ \AA}$ e número de agregação igual a 227 [77]. Isto nos leva a propor que os nossos resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que em nosso sistema, encontramos presente em solução uma concentração de sal alta. De fato a maioria dos trabalhos publicados sobre micelas de CTAC apresenta uma anisometria menor do que 2.0, porém nestes trabalhos as micelas de CTAC encontram-se em solução aquosa pura [76] e na ausência de sal. Por outro lado, tem sido constatado que o aumento da concentração salina influi significativamente na geometria da micela [77,81,82]. O número de agregação encontrado para a micela de CTAC em nossos estudos foi de 338 ± 35 em ambos os pHs (Tabela 1), um fator em torno de 1.5 maior quando comparado com as micelas catiônicas em solução de KBr [77]. Este fato poderia ser justificado pelo tipo de contra-íons presentes em solução ou pela diferença de sensibilidade das duas técnicas.

Aswal e col. [77] concluíram que a interação intermicelar é diferente para o sistema CTAC/KBr e CTAC/KCl para concentrações similares de eletrólitos. A presença de Br^- no lugar de Cl^- causa uma diferença no tamanho e na viscosidade das micelas. A adição de KBr à micelas de CTAC desloca o pico característico da micela, alargando e deslocando o mesmo para valores de q menores, indicando o crescimento da micela de CTAC pelo aumento da concentração de KBr. O alargamento do pico é devido à blindagem das cargas positivas do CTAC pela presença do eletrólito diminuindo a repulsão eletrostática. Já a adição de KCl não modificou a forma da micela. Sendo assim os autores concluíram que a interação intermicelar é diferente para o sistema CTAC/KBr e CTAC/KCl para concentrações similares de eletrólitos, levando a uma diferença no crescimento micelar e na viscosidade da micela. Eles acreditam que os íons Cl^- e Br^- solvatam a cabeça polar do surfactante de modo diferente, o que poderia ser justificado pela diferença de tamanho e do comportamento em relação à hidratação dos mesmos.

Um estudo recente desenvolvido por Jansson e col. [76] sobre a interação do surfactante catiônico CTAC com um copolímero PEO-PPO-PEO (polímero não iônico chamado Pluronic – P123), utilizando as técnicas de SAXS, DLS e RMN, mostra que a micela de CTAC na presença de 50 mM NaCl apresenta um $R_{\text{par}}=27 \text{ \AA}$, $\alpha=0.06$, o que está próximo dos valores encontrados em nossas análises. Neste trabalho os autores observaram que a adição de surfactante ao copolímero favorecia a formação de agregados menores, pois o aumento da concentração de CTAC na solução do polímero P123 em questão deslocava o q para valores menores. Entretanto, associando os dados de SAXS com os resultados obtidos de DLS (do inglês “Dynamic Light Scattering”), os autores acreditam que para altas concentrações de CTAC, ocorre a formação de uma micela pura de CTAC, além de um complexo CTAC/P123 de tamanho menor do que o polímero P123 puro.

A adição de 2mM, 5 mM e 10 mM de TPPS₄ na micela de CTAC provoca a diminuição do número de agregação da micela de CTAC de 344 ± 28 para 333 ± 44 , 272 ± 37 , e 219 ± 24 (pH 4.0, Tabela 1), respectivamente. Isto pode ser uma evidência de que a presença de porfirina nas micelas de CTAC induz um remanejamento do sistema, favorecendo a formação de micelas menores, com um centro hidrofóbico mais empacotado do que para a micela de CTAC pura, sem porfirina.

O número de agregação foi obtido usando o volume hidrofóbico da partícula espalhadora apresentado na Tabela 1 e assumindo que todo o centro hidrofóbico é devido ao surfactante (volume molar do surfactante é $459 \text{ \AA}^3$) [44]. Nesta aproximação estamos excluindo a inserção de porfirina na micela. Assumindo que o volume hidrofóbico total é composto pela soma das contribuições de surfactante e porfirina, $V = n_{\text{porf}}V_{\text{porf}} + n_{\text{surf}}V_{\text{surf}}$, e considerando o volume estimado da porfirina de $775 \text{ \AA}^3$ [33], um novo número de agregação para o CTAC pode ser facilmente estimado se a estequiometria inicial em solução é mantida na micela. Assim, no pH 4.0, o número de agregação reduz de 333, 272, 219 para 322, 251, 186 na presença de TPPS₄. Para 2 e 5 mM de porfirina estes números estão dentro do erro experimental (Tabela 1). Para 10 mM de TPPS₄, o número de agregação é menor quando comparado com o erro estimado. No pH 9.0 resultados similares são obtidos.

A redução do tamanho da micela devido á adição de porfirina pode ser causada pela aproximação eletrostática da TPPS₄ com a camada polar da micela catiônica, o que poderia diminuir a repulsão eletrostática dos monômeros de surfactante, diminuindo assim o número de

agregação. Porém este efeito não pode ser puramente eletrostático, pois em trabalhos anteriores [14-16,35] foi observada uma grande contribuição da interação hidrofóbica, o que pode ser observado pela alta constante de associação da TPPS₄ com micelas neutras e zwitteriônicas. As constantes de associação da TPPS₄ com CTAC são 10^4M^{-1} no pH 3.0 e $3.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ no pH 7.5 [16]. A TPPS₄ apresentou um valor de constante de associação para o HPS e o TX-100 similar ao obtido com o CTAC [16], o que demonstra o forte caracter hidrofóbico da TPPS₄.

É interessante notar que a partir dos parâmetros apresentados na Tabela 1 nós podemos estimar a área da superfície das micelas na presença de porfirinas. Assumindo que o anel macrociclo da porfirina apresenta uma área de 400Å^2 , a área da superfície da micela na presença de 2, 5 e 10 mM de TPPS₄, no pH 4.0, é suficiente para acomodar 12-17, 11-15 e 9-14 moléculas de porfirinas, respectivamente (o menor valor considera apenas o centro hidrofóbico e o maior valor considera além do centro hidrofóbico a dimensão da espessura polar). Com isto podemos propor que as micelas de CTAC na presença de 2 e 5 mM de TPPS₄ todas as moléculas de porfirinas poderiam se acomodar (paralelamente) a superfície externa da micela como um filme, desde que o número de moléculas de porfirina nestas concentrações sejam 6 e 12, respectivamente. Entretanto, em 10 mM de TPPS₄, nós podemos estimar o número de moléculas de porfirina que poderiam ficar na superfície das micelas, próximo de 19, este número é maior do que o número obtido nos cálculos da superfície da micela (14). Assim, com estes argumentos geométricos simples, é possível que para maior concentração de porfirina algumas moléculas são inseridas na micela com o anel porfirínico perpendicular ao plano da micela. Na figura 16 temos um esquema muito simples mostrando as mudanças induzidas na estrutura das micelas de CTAC pela porfirina aniônica. Do lado esquerdo da figura temos representado a micela de CTAC pura (100 mM de surfactante) com as dimensões obtidas dos dados de SAXS (Tabela 1). O lado direito representa a co-micela porfirina-surfactante, onde a forma é mantida, bem como as dimensões da camada polar. O tamanho micelar é reduzido e em maiores concentrações de porfirina, possivelmente algumas moléculas de TPPS₄ podem se inserir na interface polar.

Figura 16: Representação esquemática mostrando mudanças significativas induzidas pela adição de porfirinas (TPPS₄) nas micelas de CTAC (ver texto acima).

Para complementar os estudos de SAXS, uma análise das mesmas amostras através de experimentos de RPE (Ressonância paramagnética eletrônica) com os marcadores de spin nitróxidos 5-DSA e 16-DSA, derivados do ácido esteárico, foi realizado pelo aluno de mestrado Diógenes de Souza Neto. Tínhamos como objetivo observar o efeito da porfirina na dinâmica da micela de CTAC. Considerando que RPE é uma técnica extremamente sensível às alterações que ocorrem na vizinhança do fragmento paramagnético do marcador de spin, foi possível através desta técnica avaliar o grau de mobilidade dos referidos marcadores, na micela de CTAC pura e na micela mista CTAC + TPPS₄ (em diferentes concentrações de porfirina). A simulação dos espectros de RPE através do programa desenvolvido pelo grupo do Dr. Jack Freed [83] permitiu analisar de forma mais quantitativa os efeitos da porfirina nos parâmetros dinâmicos dos marcadores nitróxidos na micela. As linhas espectrais mais estreitas observadas para o 16-DSA (dados não mostrados) [84] indicaram uma maior mobilidade em relação ao 5-DSA, comportamento similar àquele observado para as micelas puras de CTAC, e que não é alterado pela presença de porfirina. Para micelas marcadas com o 5-DSA em pH 4.0 é possível notar um espectro bastante imobilizado com 10 mM de TPPS₄ em relação àquele contendo 2 mM de porfirina. Em relação ao mesmo marcador, mas agora no pH 9.0, 10 mM de TPPS₄ é

caracterizado por um espectro de maior mobilidade em relação àquele com 2 mM de porfirina [84].

Assim, além da concentração de porfirina, outro efeito determinante sobre a forma da linha dos espectros de RPE é o pH das amostras. No pH 9.0, no entanto, é possível notar uma maior imobilização do marcador 5-DSA e a eventual existência de duas componentes com 5 mM de porfirina. Os espectros do 16-DSA também exibiram diferenças tanto em relação à concentração de porfirinas como ao pH das amostras. Entretanto é possível notar visualmente que estas mudanças são mais sensíveis à concentração de TPPS₄.

De maneira geral, podemos afirmar que a adição de porfirina em ambos os pHs e para os dois marcadores levou a um aumento de restrição ao movimento nas micelas, como se a micela ficasse mais empacotada, tornando a reorientação do nitróxido mais lenta. Observamos que os parâmetros relacionados à mobilidade e polaridade do meio monitoradas pelos marcadores 5- e 16-DSA não apresentaram diferenças para 40 e 100 mM de CTAC puro [84].

Um fato importante que não foi muito bem enfatizado é que os dados obtidos de RPE para concentração de CTAC a 40 mM não correspondem às mesmas condições de equilíbrio do que o sistema CTAC a 100 mM. Ou seja, sabemos através de trabalhos anteriores em nosso grupo [16], que a TPPS₄ na presença de surfactante catiônico CTAC, para uma determinada razão CTAC/TPPS₄ (4:1), tende a máxima formação de agregação porfirina-surfactante. Tal fato poderia justificar o maior efeito da porfirina nas micelas de CTAC a 40 mM quando adicionamos 2 mM de TPPS₄ em relação às micelas de CTAC 100 mM.

Desta maneira foi constatado que, tendo-se em vista a anisometria observada pela maior largura de linhas dos espectros de RPE utilizando o marcador 5-DSA nas micelas de CTAC na ausência e na presença de porfirina, que o radical nitróxido está mais imobilizado do que quando utilizamos o marcador 16-DSA. O que nos leva a propor que apesar de SAXS não mostrar mudanças na cabeça polar do surfactante, os dados de RPE identificam a presença da TPPS₄ na camada polar da micela. Tal fato se justifica e está de acordo com a idéia de que a interação da porfirina aniônica base livre TPPS₄ com micelas catiônicas de CTAC se dá por forças eletrostáticas e hidrofóbicas [15,16,35].

1.4.1.1.4. Discussão geral dos resultados da interação das micelas de CTAC na presença da porfirina TPPS₄

Estudos anteriores descritos na literatura mostram de forma inequívoca que a porfirina aniônica forma auto-agregados em meio ácido [79,85]. Na presença do surfactante CTAC, em concentrações equimolares, independente do valor do pH, a TPPS₄ forma um complexo com CTAC o qual é baseado na formação do par iônico de cargas opostas. Em concentrações milimolares, para a razão de surfactante:porfirina em torno de 4:1, este complexo precipita em solução (Figura 17).

Figura 17: (A) TPPS₄ 2mM em solução aquosa ácida, pH 4.0 e (B) complexo porfirina-surfactante (4:1), também em solução ácida.

Assim, através deste estudo de SAXS mostramos que a adição de porfirina nas micelas de CTAC favorece a formação de agregados pequenos, com decréscimo significativo no número de agregação (n). O valor de n estimado evidencia que para maiores concentrações de porfirina

poderia ser difícil acomodar todos os macrocíclicos porfirínicos paralelamente na forma de uma camada na superfície da micela. Algumas porfirinas poderiam se localizar parcialmente dentro na micela. Na referência [84] foram apresentadas as simulações dos espectros de RPE com os marcadores 5- e 16-DSA, o que permitiu estimar o tempo de correlação rotacional, τ , bem como a polaridade média monitorada pelo nitróxido nas micelas de CTAC na ausência e na presença de porfirina. Os valores encontrados para τ nas micelas puras de CTAC em pH 4.0 foram de 1.03 ns (para o marcador 5-DSA) e 0.20 ns (para o marcador 16-DSA). Na presença de 10 mM de porfirina encontramos valores de τ de 2.41 e 0.55 ns, para o 5- e 16-DSA, respectivamente [84]. O anel porfirínico induz um aumento na restrição ao movimento bem como um decréscimo na polaridade para o 16-DSA, indicando um maior empacotamento na co-micela TPPS₄-CTAC. Por outro lado, os valores de τ no sistema CTAC-TPPS₄ implicam numa considerável diminuição na flexibilidade da micela, pois são significativamente menores quando comparados aos tempos de correlação rotacional para agregados micelares em geral. Desta forma, temos várias evidências para afirmar que a adição de porfirina modifica a estrutura original da micela de CTAC.

1.4.1.2. Interação da porfirina TMPyP com micelas de SDS

A porfirina TMPyP apresenta dois valores de pK_a um ao redor de 1 e outro em 12.6. Por isso, uma mesma espécie permanece em solução em uma ampla faixa de pH (1-12.6), e os experimentos de micelas de SDS na presença da porfirina catiônica foram realizados no pH 6.0 [19,86].

As micelas de SDS (40 mM no pH 6.0) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM na ausência e na presença de 2 e 5 mM de TMPyP podem ser descritas como um elipsóide prolato e apresentam razão axial $v = 1.6 \pm 0.1$, similar a estudos anteriores descritos na literatura para micelas de SDS pura (Figura 18) [65,66]. Todas as curvas de SAXS para micelas de SDS pura (40 e 100 mM), e na presença de TMPyP apresentaram um pico alargado ao redor de $q \approx 0.17 \text{ \AA}^{-1}$, característico do fator de forma intramicelar, como podemos observar na Figura 18. Basicamente, este pico não se alterou pela adição de porfirina, dando uma primeira evidência de que a forma da micela não é modificada pelo aumento da concentração de TMPyP, como podemos verificar pelos valores dos parâmetros de ajustes das curvas de SAXS na Tabela 2. Assim tanto para o sistema micelar com concentração de 40 mM bem como o de 100 mM de SDS no pH 6.0, a curva

de SAXS em valores de q alto ($q \text{ (}\text{\AA}^{-1}\text{)} > 0.1$), onde $S(q) \sim 1$, é determinada principalmente pelo fator de forma intramicelar $P(q)$ da micela. Observamos que a função $P(q)$ independe da concentração de porfirina para valores de $q > 0.1$ (Tabela 2). Isto é possível para sistemas onde a micela possui a forma elipsoidal e dimensões pequenas, sendo estas independentes da concentração de eletrólito [77]. As linhas sólidas na figura 18 representam os melhores ajustes das curvas experimentais das micelas de SDS, utilizando o método de Hayter e Penfold [67,68] descrito anteriormente, pela equação 1, que assume micelas esféricas carregadas que interagem por forças Coulômbicas e de Van der Waals.

Por outro lado, observamos que a função $S(q)$ (função interferência) diminui com o aumento da concentração de TMPyP, o valor de $\alpha=0.065$ da micela de 100 mM de SDS puro é reduzido para $\alpha=0.020$ na presença de 10 mM de TMPyP. Isto poderia ser justificado pelo fato que a porfirina possivelmente estaria blindando os grupos polares carregados da micela de SDS, diminuindo desta forma a função interferência intermicelar ($S(q)$). Nas micelas de SDS a 40 mM foi observado um fenômeno similar. O valor do coeficiente de ionização na ausência de porfirina foi de $\alpha=0.03$ para 40 mM SDS, e na presença de 5 mM de TMPyP, o valor de α , diminuiu para 0.01. A adição de TMPyP nas micelas de SDS 40 mM, assim como nas micelas de 100 mM SDS não modificou drasticamente a forma da micela, apenas diminuiu a contribuição da $S(q)$.

Os valores da espessura da camada polar, da densidade eletrônica polar e do raio parafínico obtidos dos ajustes das curvas de SAXS das micelas de 100 mM e 40 mM SDS são bastante similares. O único parâmetro de forma que apresenta uma diferença significativa é a razão axial. Tanto as micelas em 40 mM SDS como em 100 mM SDS são descritas como um elipsóide prolato com razão axial de $v = 1.6 \pm 0.1$ e 1.9 ± 0.1 , respectivamente.

O fato de $q_{\text{médio}}$ (distância média entre as partículas) ser diferente nas micelas de SDS 40 e 100 mM justifica a diferença no tamanho da micela. Quando a concentração de moléculas de surfactante é maior, ocorre o deslocamento para valores de q maior devido ao decréscimo na distância média entre as micelas. Isto poderia justificar o fato de não observarmos nitidamente a função interferência nas micelas de SDS 40 mM, quando comparada as micelas de SDS 100 mM na faixa de valores de q do experimento.

Figura 18: Curvas de SAXS do surfactante SDS 40 mM (A,B,C), e 100 mM SDS (D,E), no pH 6.0, em função da concentração da porfirina TMPyP. As linhas contínuas correspondem aos ajustes do produto $P(q)S(q)$ obtidos usando o modelo do elipsóide prolato. Os parâmetros dos ajustes são dados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores dos parâmetros de ajuste das curvas de SAXS das amostras compostas por 40 (as primeiras três linhas) e 100 mM (as últimas duas linhas) de SDS a concentrações crescentes de TMPyP, obtidos através da modelagem de $P(q)$ e $S(q)$.

pH 6.0					
<i>TMPyP</i> (mM)	R_{par} (Å)	σ (Å)	ρ_{pol} ($e/\text{\AA}^3$)	ν	α
0	17.0 (1)	6.70 (5)	0.390(3)	1.6 (1)	0.030(5)
2	17.0 (1)	6.70 (5)	0.390(3)	1.6 (1)	0.020(5)
5	16.8 (3)	6.80 (5)	0.390(3)	1.6 (1)	0.010(5)
0*	17.0 (1)	6.90 (3)	0.390(1)	1.9 (1)	0.065(3)
10*	17.0 (1)	6.92 (2)	0.390(2)	1.9 (1)	0.020(1)

R_{par} = menor eixo parafínico, σ = espessura da camada polar, ρ_{pol} = densidade eletrônica da camada polar, ν = razão axial entre os eixos maior e menor (parte parafínica) e α = coeficiente de ionização. Foi utilizado o modelo elipsóide prolato para a $P(q)$. Os números em parênteses correspondem aos erros dos ajustes associado ao ultimo algarismo significativo.

A figura 19 apresenta um esquema simples evidenciando as mudanças mais significativas induzidas pela porfirina na estrutura da micela. O lado esquerdo da figura mostra a micela pura de SDS com as dimensões obtidas pelos dados de SAXS (Tabela 2). O lado direito da figura mostra a co-micela porfirina-surfactante, onde a forma é mantida bem como as dimensões da camada polar. O coeficiente de ionização é reduzido com o aumento da concentração de porfirina, o que pode justificar a neutralização parcial das cargas da cabeça polar das micelas pela porfirina, refletindo numa menor repulsão intermicelar. No sistema CTAC-TPPS₄, onde uma forte interação ocorre, o tamanho da micela é reduzido com o aumento da concentração de porfirina e possivelmente algumas porfirinas são inseridas dentro da interface polar da micela.

Figura 19: Representação esquemática mostrando as mudanças mais significativas induzidas pela adição de porfirinas (TMPyP) nas micelas de SDS (ver texto acima).

1.4.1.2.1 Discussão geral dos resultados da interação das micelas de SDS na presença da porfirina TMPyP

A interação da TMPyP com surfactantes iônicos e não-íonicos é devido principalmente a interações eletrostáticas, devido a ausência de um caráter hidrofóbico mais acentuado desta porfirina. Um artigo nosso submetido recentemente [19], indica que a porfirina praticamente não interage com surfactantes neutros e zwitteriônicos. Estes estudos foram realizados utilizando

diferentes técnicas espectroscópicas [19]. A TMPyP apresenta uma menor hidrofobicidade do anel porfirínico quando comparada à TPPS₄. Isto pode estar relacionado com o fato de que as cargas positivas da porfirina catiônica são mais delocalizadas por todo o anel porfirínico, devido ao efeito de ressonância dos grupos metilpiridil em oposição à carga negativa dos grupos sulfonatos da porfirina aniônica nos substituintes ser bem localizada. Esta menor densidade de carga dos grupos substituintes da porfirina catiônica em função da delocalização do anel porfirínico, explica a menor constante de associação da TMPyP com as micelas de SDS [19] comparada ao sistema CTAC-TPPS₄ [16]. Como mencionado anteriormente, na porfirina aniônica a carga iônica nos substituintes é mais pontual nos sítios de interação (grupos sulfonatos), justificando a interação eletrostática mais efetiva da TPPS₄ com os surfactantes catiônicos. As constantes de associação (K_b) da TPPS₄ com o CTAC são $(10.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ no pH 3.0 e $(32 \pm 2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ no pH 7.5 [16]; a constante de associação da TMPyP com o SDS no pH 6.0 é $(1.97 \pm 0.03) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ [19]. A porfirina TPPS₄ apresentou um valor de K_b para o CTAC significativamente maior do que quando comparado ao par TMPyP-SDS. A porfirina aniônica apresentou um valor de constante de associação para o HPS e TX-100 similar ao obtido com o CTAC [16]. Isto demonstra o forte caráter hidrofóbico desta porfirina. Já para a TMPyP não foi possível estimar um valor de constante de associação com os surfactantes HPS e TX-100, devido ao fato de que a adição destes surfactantes nas amostras de TMPyP não modificou significativamente os espectros de absorção ótica, fluorescência e espalhamento de luz ressonante (RLS) [19].

A menor hidrofobicidade do anel porfirínico da TMPyP quando comparada com a TPPS₄, poderia explicar o fato de que a porfirina aniônica, TPPS₄, tem uma tendência maior de agregar-se em solução aquosa, enquanto que a porfirina catiônica, TMPyP, não tem tal comportamento. Esta observação está de acordo com os resultados descritos por Pasternack e colaboradores [86].

1.4.2. Estudos de supressão de fluorescência das porfirinas TMPyP e TPPS₄ em diferentes tipos de micelas.

1.4.2.1. Supressão de fluorescência da TMPyP na ausência e na presença de micelas nas temperaturas de 25 e 50 °C.

Os experimentos de supressão de fluorescência das porfirinas foram realizados em diferentes sistemas micelares e analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer (eq. 28) e a equação de Stern-Volmer modificada, levando em consideração a supressão dinâmica e estática (eq. 29). A eficiência de supressão depende da localização do par fluoróforo/supressor. Os estudos de supressão de fluorescência foram realizados com o supressor iônico iodeto de potássio (KI).

Os espectros de emissão de fluorescência na titulação da TMPyP com o supressor aniônico KI foram obtidos em diferentes valores de pH (2.0, 6.0 e 9.0) e na presença de surfactantes. O espectro de emissão da TMPyP em solução tampão apresenta uma banda alargada em 652 nm em todos os valores de pH estudados (pH 2.0, 6.0 e 9.0). Na presença de micelas de SDS o espectro de fluorescência da TMPyP aparece com uma banda intensa em 652 nm e uma segunda banda menor (ombro) em 709 nm. O espectro de emissão da TMPyP na presença das micelas de HPS e TX-100 é idêntico ao espectro da porfirina em tampão.

A figura 20A apresenta os espectros de emissão da TMPyP em tampão acetato-fosfato-borato pH 6.0 em função de diferentes concentrações de supressor (KI). Na figura 20B mostramos os gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP em tampão e na presença de diferentes micelas. O ajuste é linear na faixa de menores concentrações de supressor (0-6 mM, como observamos no inserto da figura) usadas neste estudo, e a constante de supressão K_{SV} apresentada nas Tabelas 3-6 corresponde aos ajustes lineares. É importante notar que as concentrações de supressor necessárias para suprimir a fluorescência da TMPyP são um fator de 4-10 vezes menores quando comparadas com as da TPPS₄. Em altas concentrações de supressores os ajustes não foram lineares, sendo utilizada nos ajustes a equação quadrática (eq. 29) fornecendo os valores de K_D e K_S , mostrados nas Tabelas 3-6. Os valores de K_D obtidos pelo ajuste da equação quadrática (eq. 29) são na maioria dos casos muito menores quando comparados com os valores

de K_{SV} obtidos pelo ajuste linear. Além disso, os valores de K_S são significativamente menores em relação aos valores de K_D .

Os dados de supressão de fluorescência obtidos para a TMPyP em solução tampão em todos os valores de pH estudado são muito similares (Tabela 3). Este resultado pode ser explicado devido ao fato desta porfirina apresentar dois valores de pK_a , um em torno de 1 (espécie diácida) e outro em torno de 12.6 (espécie monoaniônica), ou seja, numa ampla faixa de pH temos sempre a mesma espécie presente em solução, como mencionado anteriormente. Por isso, experimentos de supressão de fluorescência da TMPyP na presença de diferentes micelas foram realizados apenas no pH 6.0. Estes resultados estão em concordância com o fato da TMPyP não formar agregados para uma faixa extensa de valores de pH. Assim, podemos dizer que esta porfirina se encontra na forma monomérica, uma vez que estas estruturas foram igualmente acessíveis ao supressor em uma ampla faixa de pH.

A partir do coeficiente angular da reta dos gráficos de Stern-Volmer da TMPyP em pH 6.0 à 25°C, na faixa de concentração baixa, nós obtivemos os valores de K_{SV} . Os valores de K_{SV} obtidos para a TMPyP em solução tampão ($K_{SV} \approx 150 \text{ M}^{-1}$) foram bastante similares em todos os valores de pH (Tabela 3). Os valores de K_D e K_S são, respectivamente, em torno de 120 M^{-1} e 0.02 M^{-1} . A constante de supressão bimolecular k_q , que mede a acessibilidade da porfirina ao supressor, foi calculada pela relação $K_{SV} = \tau \times k_q$, onde τ é o tempo de vida da porfirina na ausência de supressor. Os valores de τ usados neste estudo foram obtidos através da técnica de fluorescência no domínio da frequência e estão de acordo com os dados descritos previamente na literatura [7,8,87,88]. Vale salientar que alguns autores reportaram que a TMPyP apresenta dois tempos de vida, 5.0 e 1.5 ns [7,8,87,88]. Entretanto, a contribuição do tempo curto no decaimento corresponde a uma fração pequena em relação ao tempo longo, o que tem contribuído para diferentes interpretações, tais como agregação do macrociclo ou porfirina adsorvida na parede da cubeta [88]. Em nossos experimentos observamos apenas um único tempo de vida ao redor de 5.0 ns. Usando $\tau = 4.94 \text{ ns}$ para a TMPyP em solução tampão, para todos os valores de pH, o valor de k_q estimado para a TMPyP foi de $\approx 2.4\text{-}3.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabela 3). Este valor de k_q é um fator de 2-3 vezes maior do que o limite difusional, que é ao redor de $1.0\text{-}1.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [70], sugerindo uma pequena contribuição da supressão estática devido à formação de complexo porfirina-supressor. É interessante que a supressão dinâmica obtida para a TMPyP em tampão, diretamente

do ajuste linear da razão $\tau_0 / \tau \times [KI]$, apresenta um valor de K_D de $97 \pm 1 \text{ M}^{-1}$, o qual é próximo ao valor obtido do ajuste com a equação quadrática (eq.29).

A figura 20B mostra os ajustes dos gráficos de Stern-Volmer da TMPyP na presença de diferentes micelas de surfactantes, os quais são lineares para concentrações baixas de supressor (0-6 mM) para todas as micelas. O valor de K_{SV} obtido para a porfirina na presença de micelas de TX-100 foi de 154 M^{-1} , o valor de K_D foi de 144 M^{-1} , e o valor de K_S muito pequeno quando comparado ao K_D . Estes valores são bastante similares aos encontrados para a porfirina pura. Por outro lado, o valor encontrado para o tempo de vida da porfirina no domínio da frequência indica que algumas porfirinas podem estar ligadas às micelas de TX-100, apresentando um valor de $\tau=10\text{ns}$. O decaimento de fluorescência é bi-exponencial indicando que o tempo de vida curto está associado à porfirina livre em solução (5 ns, 67%) e o tempo longo à porfirina ligada à micela (10 ns, 33%) (Tabela 3). Provavelmente, em altas concentrações de surfactante a contribuição da porfirina livre ($\tau=5\text{ns}$) poderia ser ainda mais reduzida.

Na presença de HPS (Figura 20B), o valor de K_{SV} é um fator 2-3 vezes menor do que o obtido em tampão, sugerindo que as micelas de HPS poderiam proteger a TMPyP do supressor, devido a alguma associação entre porfirina-HPS. Essa associação é sem dúvida significativamente menor quando comparada ao sistema porfirina/SDS. O valor obtido de τ , em duas concentrações diferentes de HPS, mostra um decaimento monoexponencial para 20 mM de HPS com um tempo de vida de 5 ns, característico da porfirina livre em solução. Um decaimento biexponencial para 40 mM HPS foi observado, porém observamos uma contribuição menor do que 10% do tempo de vida bastante curto (1.75ns, 4%) (Tabela 3). Provavelmente, este tempo curto pode ser considerado um artefato experimental. Os valores observados de K_S são maiores do que o da porfirina pura, porém são ainda muito menores do que o valor de K_D .

A TMPyP na presença de 20 mM e 40 mM de SDS apresentou os seguintes valores de K_{SV} : 8.1 M^{-1} e 6.7 M^{-1} , respectivamente (Tabela 3). Estes valores de K_{SV} são muito menores do que os valores encontrados em tampão e significam que a porfirina solubilizada nas micelas de SDS não está acessível ao supressor aniônico como em tampão. Nossos resultados são similares aos obtidos para porfirinas hidrofóbicas em vesículas de fosfolípidos [89,90]. Os valores de K_D encontrados são similares aos obtidos pelo K_{SV} , além do fato do K_S ser muito menor do que o valor de K_D , indicando a ausência de supressão estática. Os valores de k_q encontrados foram $6.6 - 7.9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ indicando que no sistema TMPyP-SDS, temos possivelmente somente supressão

colisional. Além do fato, de observamos um único valor de τ (10 ns), referente á porfirina ligada às micelas, e consistente com a forte interação entre a porfirina catiônica e o surfactante aniônico. Maiti e colaboradores encontraram para o sistema TMPyP + 16 mM de SDS um decaimento bi-exponencial, com tempos de vida de 10 ns (90%) e 1.5 ns (10%) [7]. Neste trabalho os autores não estudaram a TMPyP na presença dos surfactantes HPS e TX-100 [7]. O valor de K_S é o menor valor observado para todas as medidas da TMPyP (Tabela 3). A supressão observada sugere que a TMPyP está na interface micelar e ao alcance do meio aquoso para ser suprimida pelo anion iodeto. O aumento da concentração de SDS, leva a uma considerável redução de supressão de fluorescência, entretanto, as micelas de SDS poderiam proteger a TMPyP, decrescendo o valor de K_{SV} . De fato as moléculas de TMPyP são menos acessíveis ao supressor iodeto, o que poderia ser justificado devido a interação que ocorre entre a porfirina catiônica e a micela aniônica. Esta interação mantém o anel porfirinico na camada de Stern, reduzindo a acessibilidade do supressor iodeto, o qual é repelido também pela cabeça polar do surfactante aniônico.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos dos experimentos de supressão de fluorescência em alta temperatura ($T=50^\circ\text{C}$). Em princípio, o aumento da temperatura deveria levar a um aumento da supressão dinâmica, e redução da contribuição da supressão estática. Além disso, o aumento da temperatura pode provocar um decréscimo no tempo de vida e na emissão de fluorescência devido ao aumento da contribuição de processos não-radioativos. Vale mencionar que a estrutura micelar não deveria sofrer modificações drásticas na faixa de temperatura entre $25-50^\circ\text{C}$, pois este sistema é bastante flexível e não apresenta transição de fase.

Entretanto, de acordo com os dados apresentados na Tabela 4, observamos que os resultados obtidos para a porfirina em tampão em $T=50^\circ\text{C}$ são bastante similares aos resultados apresentados na temperatura menor. O valor do tempo de vida permanece constante (5 ns) e ocorre um pequeno aumento nos valores de K_D e K_{SV} . A TMPyP na presença de micelas de HPS e TX-100 apresentou um aumento significativo nas constantes de supressão (Tabela 4). O tempo de vida permanece essencialmente idêntico a temperatura baixa, apresentando apenas um decaimento mono-exponencial em todos os sistemas. Os resultados apresentados para a TMPyP na presença de micelas de SDS sugerem que mesmo em 50°C a porfirina se liga fortemente às micelas. Ao mesmo tempo, a porfirina se torna mais acessível ao supressor, como esperado para temperaturas mais altas.

Figura 20: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 6.0. [TMPyP] = 12.8 μ M e $0 < [KI] < 11.9$ mM. O comprimento de onda de excitação é 515 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP obtidos de medidas de fluorescência no estado estacionário em solução tampão, micelas de SDS, micelas de HPS e micelas de TX-100. As linhas cheias em preto correspondem aos ajustes de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inserto mostrando o ajuste linear para baixas concentrações de supressor.

Tabela 3: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TMPyP obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes surfactantes em diferentes valores de pH. O supressor utilizado foi o KI e $[TMPyP] = 10 \mu M$ em $T = 25^\circ C$.

Amostras	^a $K_{sv} (M^{-1})$	^b $K_D (M^{-1})$	^c $K_S (M^{-1})$	^d $\tau_f (ns)$	^e $k_q (M^{-1}s^{-1})$
Tampão pH 2.0	155 ± 3	121 ± 3	0.018 ± 0.006	4.94 ± 0.02	$2.5-3.1 \times 10^{10}$
Tampão pH 6.0	151 ± 3	119 ± 5	0.021 ± 0.005	4.94 ± 0.02	$2.4-3.1 \times 10^{10}$
Tampão pH 9.0	151 ± 3	128 ± 4	0.016 ± 0.004	4.94 ± 0.02	$2.6-3.1 \times 10^{10}$
20 mM TRITON X-100 pH 6.0	154 ± 2	144 ± 4	0.006 ± 0.0002	* $10 \pm 1(33\%)$ e $5.0 \pm 0.2(67\%)$	$1.4-1.5 \times 10^{10}$ e $2.9-3.1 \times 10^{10}$
40 mM HPS pH 6.0	57 ± 3	42 ± 2	0.064 ± 0.002	* $1.75 \pm 0.56(4\%)$ e $5.18 \pm 0.06(96\%)$	$2.4-3.2 \times 10^{10}$ e $0.8-1.1 \times 10^{10}$
20 mM HPS pH 6.0	73 ± 4	55 ± 3	0.047 ± 0.002	5.01 ± 0.02	$1.1-1.5 \times 10^{10}$
40 mM de SDS pH 6.0	6.7 ± 0.4	6.4 ± 0.8	0.003 ± 0.002	10.20 ± 0.04	$6.3-6.6 \times 10^8$
20 mM SDS pH 6.0	8.1 ± 0.3	8.0 ± 1.4	0.0003 ± 0.0001	10.20 ± 0.02	$7.8-7.9 \times 10^8$

^a Constantes de Stern-Volmer obtidas do ajuste linear em baixas concentrações de supressor (ver texto).

^b Constantes de supressão dinâmica do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^c Constantes de supressão estática obtidas do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^d Tempos de vida de fluorescência obtidos do decaimento mono-exponencial, exceto onde marcado com *, que corresponde a um decaimento bi-exponencial.

^e Constantes de supressão bimolecular calculadas a partir da razão K_D/τ_f (valor menor) ou K_{SV}/τ_f (valor maior).

Tabela 4: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TMPyP obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes surfactantes em diferentes valores de pH. O supressor utilizado foi o KI e $[TMPyP] = 10 \mu M$ em $T = 50^\circ C$.

Amostras	$^a K_{SV} (M^{-1})$	$^b K_D (M^{-1})$	$^c K_S (M^{-1})$	$^d \tau_f (ns)$	$^e k_q (M^{-1}s^{-1})$
Tampão	168 ± 6	160 ± 4	0.03 ± 0.002	4.92 ± 0.02	$3.1-3.4 \times 10^{10}$
20 mM TRITON X-100	470 ± 20	360 ± 30	0.42 ± 0.1	6.01 ± 0.03	$6.0-7.8 \times 10^{10}$
40 mM HPS	340 ± 10	270 ± 10	0.097 ± 0.004	5.21 ± 0.02	$5.2-6.5 \times 10^{10}$
40 mM de SDS	12 ± 1	7.70 ± 1.0	0.008 ± 0.0007	9.54 ± 0.04	$0.8-1.2 \times 10^9$

^a Constantes de Stern-Volmer obtidas do ajuste linear em baixas concentrações de supressor (ver texto).

^b Constantes de supressão dinâmica do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^c Constantes de supressão estática obtidas do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^d Tempos de vida de fluorescência obtidos do decaimento mono-exponencial.

^e Constantes de supressão bimolecular calculadas a partir da razão K_D/τ_f (valor menor) ou K_{SV}/τ_f (valor maior).

1.4.2.2. Supressão de fluorescência da TPPS₄ na ausência e na presença de micelas nas temperaturas de 25 e 50 °C.

O espectro de fluorescência da TPPS₄ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM em pH 2.0 e 3.0 apresenta uma banda alargada em 662nm (Figura 21). No pH 7.5, o espectro de fluorescência apresenta uma banda alargada intensa em 648 nm e uma segunda banda menos intensa em 710 nm (Figura 22). Na presença de micelas de CTAC, HPS e TX-100 o espectro de fluorescência da TPPS₄ apresenta uma banda intensa em 648 nm e uma segunda banda menos intensa em 710 nm em todos os valores de pH, o que é muito similar ao espectro observado para a porfirina em tampão pH 7.5. A figura 21 mostra os espectros de fluorescência da TPPS₄ em tampão pH 3.0 na presença de várias concentrações de KI. A figura 21C apresenta a linearidade do gráfico de Stern-Volmer para baixas concentrações de supressor (0-16 mM, ver inserto), usado para estimar os valores de K_{SV} (Tabela 5). Observamos mudanças significativas nos valores de K_{SV} e k_q para a TPPS₄ em função dos valores de pH, ao contrário da TMPyP. Isto é devido ao equilíbrio de protonação da porfirina aniônica, o que foi explicado anteriormente. Assim, devido

a que o valor de pK_a da TPPS₄ é em torno de 4.8 [16], os experimentos de supressão de fluorescência foram realizados em pHs ácidos (pH 2.0 e 3.0) e no pH alcalino (pH 7.5).

No pH 2.0 e 3.0 nós encontramos uma supressão colisional no limite difusional ($k_q = 1.5 \times 10^{10}$ e $1.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente), enquanto que no pH 7.5 ($k_q = 1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Observamos uma redução na acessibilidade do fluoróforo devido à repulsão eletrostática entre os grupos sulfonatos e o supressor, levando ao decréscimo do k_q por uma ordem de magnitude. O aumento no valor do τ no pH 7.5 contribui para o menor valor de k_q . Os nossos valores de τ para a TPPS₄ em tampão puro (Tabela 5) são bastante similares aos reportados por Maiti e colaboradores [7,8]. É interessante observar que a interação da porfirina com micelas de CTAC elimina a diferença de supressão para diferentes valores de pH. Os valores de K_{SV} são similares aos valores de K_D , enquanto que o valor de K_S é significativamente menor quando comparado ao valor de K_D .

Como mencionado anteriormente a TPPS₄ apresenta uma forte interação com as micelas de CTAC [16]. Baseando-se em experimentos de RMN ¹H [16] e SAXS [84] podemos sugerir que a porfirina se localiza na região apolar das micelas de CTAC. Entretanto, os valores obtidos de K_{SV} para o sistema TPPS₄-CTAC são maiores ou iguais do que a TPPS₄ em tampão puro (Tabela 5). Comparando os valores de k_q apresentados na tabela 5, observamos que a porfirina na presença de CTAC, apresenta um valor de k_q 2-3 vezes menores do que a porfirina em tampão puro para valores de pH ácido (2.0 e 3.0) e um fator 3 vezes maior no pH 7.5. A forte interação da TPPS₄ com micelas de CTAC favorece a aproximação do supressor I⁻ com a porfirina. Provavelmente, a alta concentração local do supressor ocorre próximo da cabeça polar do surfactante catiônico e isto é consistente com a alta supressão do íon iodeto mesmo quando a porfirina está fortemente ligada às micelas. Esta supressão é predominantemente colisional, assim como no sistema TMPyP-SDS.

A TPPS₄ na presença de micelas neutras de TX-100 apresentou um decréscimo na constante K_{SV} quando comparado com o tampão (Tabela 5). Sabe-se que esta porfirina interage fortemente com o TX-100 e localiza no meio apolar. Esta interação pode causar uma maior dificuldade do supressor em se aproximar da porfirina, causando um decréscimo no valor de K_{SV} . O valor de tempo de vida determinado pela fluorescência no domínio da frequência foi ao redor de 11.0 ns para todos os valores de pH. Este resultado é similar aos obtidos por Maiti e colaboradores [7], onde o valor de τ de 11.8 ns foi obtido para a porfirina em pH neutro,

enquanto que um decaimento bi-exponencial com valores de τ de 11.8 (70%) e 3.3 (30%) ns foi observado para pH ácido. Entretanto, este tempo curto não foi detectado em nossas análises.

Na presença de micelas de HPS, os valores de K_{SV} encontrados foram significativamente menores do que os encontrados em tampão puro, para todos os valores de pH; entretanto, estes valores são menores do que os encontrados para o sistema TPPS₄/TX-100. As micelas zwitteriônicas de HPS têm ambas as cargas positiva e negativa na cabeça polar do surfactante, portanto, pode ocorrer uma repulsão da carga negativa (a mais exposta da cabeça polar) da camada polar do surfactante com o supressor aniônico. Fenômeno contrário ao que ocorre com o CTAC. Baseando-se nas medidas experimentais de tempo de vida, estimamos os valores de k_q obtidos para o sistema TPPS₄-HPS em diferentes valores de pH (Tabela 5). Estes valores são maiores do que os valores obtidos com o TX-100 e menores quando comparado com o CTAC. O que pode ser justificado pelo fato da supressão ser mais efetiva nas porfirinas na presença de micelas de CTAC, devido a atração eletrostática do íon iodeto com as cabeças polares do surfactante catiônico, apresentando uma maior concentração de supressor na interface.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a TPPS₄ na ausência e na presença de diferentes micelas em vários valores de pH em T=50°C. Estes resultados são bastante similares aos obtidos em T=25°C. Observamos uma redução moderada no tempo de vida da porfirina em pH ácido e na presença de HPS e CTAC. Os valores de K_{SV} encontrados para a porfirina em tampão puro e na presença de CTAC são similares, e o valor de K_{SV} é mais alto para o sistema com HPS e TX-100, porém bem menores do que para os sistemas com a TMPyP. O valor observado para a supressão estática é muito menor para a TPPS₄ em tampão puro, sugerindo uma supressão colisional pura, que para a porfirina em tampão e em pHs ácidos está no limite difusional.

Figura 21: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TPPS₄ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 3.0. [TPPS₄] = 10 μ M e 0 < [KI] < 51.0 mM. O comprimento de onda de excitação é 528 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TPPS₄ obtidos da fluorescência medida no estado estacionário em solução tampão nos valores de pH 2.0, 3.0 e 7.5. As linhas cheias em preto correspondem aos ajustes de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inseto mostrando os ajustes lineares para baixas concentrações de supressor.

Figura 22: (A) Espectro de emissão de fluorescência da TPPS₄ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.5. [TPPS₄] = 10 μM e 0 < [KI] < 51.0 mM. O comprimento de onda de excitação é 528 nm. (B) Gráfico de Stern-Volmer para a TPPS₄ obtidos da fluorescência medida no estado estacionário em solução tampão no pH 7.5 na presença de micelas de CTAC, HPS e TX-100. As linhas cheias em preto correspondem aos ajustes de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inseto mostrando os ajustes lineares para baixas concentrações de supressor.

Tabela 5: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TPPS₄ obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes surfactantes em diferentes valores de pH. O supressor utilizado foi o KI e [TPPS₄]=10 µM em T=25°C.

Amostra	^a K _{sv} (M ⁻¹)	^b K _D (M ⁻¹)	^c K _S (M ⁻¹)	^d τ _f (ns)	^e k _q (M ⁻¹ s ⁻¹)
Tampão pH 2.0	58 ± 2	43 ± 2	0.005 ± 0.0002	3.64 ± 0.02	1.2-1.6 x 10 ¹⁰
Tampão pH 3.0	44 ± 2	29 ± 1	0.006 ± 0.0003	3.65 ± 0.02	0.8-1.2 x 10 ¹⁰
Tampão pH 7.5	15 ± 1	11 ± 1	0.004 ± 0.0002	9.67 ± 0.04	1.1-1.6x 10 ⁹
20 mM triton X-100 pH 2.0	6.7 ± 0.5	-	-	12.30 ± 0.07	5.4 x 10 ⁸
20 mM triton X-100 pH 3.0	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.002 ± 0.0005	12.50 ± 0.07	1.0-1.2 x 10 ⁸
20 mM triton X-100 pH 7.5	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.001 ± 0.0004	12.30 ± 0.05	0.9-1.2 x 10 ⁸
20 mM HPS pH 2.0	9.0 ± 0.1	6.7 ± 0.2	0.0009±0.00001	11.10 ± 0.06	6.0-8.1 x 10 ⁸
20 mM HPS pH 3.0	7.8 ± 0.1	-	-	11.10 ± 0.06	7.0 x 10 ⁸
20 mM HPS pH 7.5	7.0 ± 0.1	-	-	11.60 ± 0.07	6.0 x 10 ⁸
40 mM CTAC pH 2.0	58 ± 2	-	-	11.10 ± 0.04	5.2 x 10 ⁹
40 mM CTAC pH 3.0	54 ± 3	38 ± 4	0.11 ± 0.05	11.10 ± 0.04	3.4-4.9 x 10 ⁹
40 mM CTAC pH 7.5	59 ± 2	-	-	11.00 ± 0.04	5.4 x 10 ⁹

^a Constantes de Stern-Volmer obtidas do ajuste linear em baixas concentrações de supressor (ver texto).

^b Constantes de supressão dinâmica do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^c Constantes de supressão estática obtidas do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^d Tempos de vida de fluorescência obtidos do decaimento mono-exponencial, exceto onde marcado com *, que corresponde a um decaimento bi-exponencial.

^e Constantes de supressão bimolecular calculadas a partir da razão K_D/τ_f (valor menor) ou K_{SV}/τ_f (valor maior).

Tabela 6: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TPPS₄ obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes surfactantes em diferentes valores de pH. O supressor utilizado foi o KI e [TPPS₄]=10 µM em T=50°C.

Amostras	^a K _{SV} (M ⁻¹)	^b K _D (M ⁻¹)	^c K _S (M ⁻¹)	^d τ _f (ns)	^e k _q (M ⁻¹ s ⁻¹)
Tampão pH 2.0 ^a	30 ± 1	25.5 ± 0.9	0.006±0.0003	2.55 ± 0.01	1.0-1.2 x 10 ¹⁰
Tampão pH 3.0 ^a	33 ± 3	21 ± 2	0.009±0.0003	2.67 ± 0.01	0.8-1.2 x 10 ¹⁰
Tampão pH 7.5 ^a	14 ± 1	11 ± 1	0.003±0.0001	9.54 ± 0.04	1.47-1.50 x 10 ⁹
20 mM triton X-100 pH 2.0 ^a	44 ± 1	42 ± 2	0.004±0.0005	11.70 ± 0.05	3.6-3.8 x 10 ⁸
20 mM HPS pH 2.0 ^a	33 ± 1	30 ± 2	0.002±0.0006	10.9 ± 0.04	2.7-2.8 x 10 ⁸
40 mM CTAC pH 2.0 ^a	60 ± 2	52 ± 4	0.011±0.003	10.60 ± 0.04	4.9-5.7 x 10 ⁹

^a Constantes de Stern-Volmer obtidas do ajuste linear em baixas concentrações de supressor (ver texto).

^b Constantes de supressão dinâmica do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^c Constantes de supressão estática obtidas do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^d Tempos de vida de fluorescência obtidos do decaimento mono-exponencial, exceto onde marcado com *, que corresponde a um decaimento bi-exponencial.

^e Constantes de supressão bimolecular calculadas a partir da razão K_D/τ_f (valor menor) ou K_{SV}/τ_f (valor maior).

1.4.2.3. Discussão geral dos resultados de supressão de fluorescência da TMPyP e TPPS₄ na ausência e na presença de micelas

As micelas são conhecidas por serem sistemas flexíveis, dinâmicos, com uma mobilidade interna considerável. Com base em trabalhos anteriores de nosso grupo onde determinamos as constantes de associação (K_b) para a TPPS₄ e a TMPyP com surfactantes iônicos e não-iônicos podemos afirmar que as porfirinas permanecem ligadas às micelas mantendo-se em constante movimento entre a interface próxima da cabeça polar e a cadeia hidrofóbica e a fase aquosa, de forma similar ao que ocorre com os monômeros de surfactantes. O maior valor de K_b está associado à probabilidade menor para a porfirina localizar-se na fase aquosa ou ser acessível à fase aquosa.

Assim, os nossos dados sugerem que quando a porfirina interage com um surfactante de carga oposta um valor alto de K_b é observado. Simultaneamente os valores de constante de supressão bimolecular k_q utilizando como supressor o íon iodeto, também é bastante dependente da cabeça polar do surfactante. Desta forma, apesar da constante de associação entre o par TPPS₄-CTAC ser um fator 5 vezes maior em comparação com o sistema TMPyP-SDS, os valores de k_q para o I⁻ suprimir a fluorescência da TPPS₄ na presença de CTAC é um fator 10 maior em comparação com o sistema TMPyP-SDS. Isto se deve, provavelmente, devido à atração do supressor aniônico com a carga positiva do CTAC e a repulsão com a carga negativa do SDS. Este efeito leva a uma maior concentração de ânions iodeto na interface micelar do CTAC quando comparada ao SDS. Baseando-se nestes fatos na figura 23 estamos apresentando um modelo representativo da localização do supressor nas porfirinas TPPS₄ e a TMPyP em solução aquosa pura, e na presença de micelas de CTAC e SDS, respectivamente.

Comparando os valores de k_q para ambas as porfirinas em micelas de TX-100 observamos claramente que a interação da TMPyP com esta micela não é significativa, enquanto que para a TPPS₄ observamos uma redução significativa no valor de k_q em comparação com a porfirina pura, justificada pela sua forte interação (da TPPS₄) com a micela neutra. Finalmente, a forte ligação entre a TPPS₄ e micelas de HPS, justifica o menor valor de k_q em relação ao CTAC, o que implica uma proteção do fluoróforo em termos de acessibilidade ao supressor. Apesar da constante de ligação entre o par TPPS₄-HPS ser semelhante ao par TPPS₄-CTAC, o baixo valor de k_q está relacionado à ausência de atração eletrostática significativa entre os íons iodeto e a cabeça polar do surfactante zwitteriônico (carga total nula).

Neste estudo, os gráficos de Stern-Volmer são lineares em concentrações baixas de supressores. Entretanto, para se ajustar o gráfico de Stern-Volmer para toda a faixa de concentração de supressor, foi necessário o uso da equação quadrática, onde as supressões dinâmica e estática foram incluídas. Em todos os casos, a supressão estática é significantemente menor quando comparada à supressão dinâmica. Os nossos dados de tempo de vida de fluorescência obtidos em um fluorímetro no domínio da frequência são consistentes com dados relatados na literatura [7,87,88]. Os decaimentos de tempo de vida bi-exponenciais para alguns casos da TMPyP na presença de micelas de TX-100 e HPS requerem estudos futuros mais detalhados.

Figura 23: Modelo esquemático da supressão de fluorescência da (A) porfirina catiônica, (B) porfirina aniônica na ausência de micelas de surfactantes; (C) a porfirina catiônica em micelas de SDS e (D) a porfirina aniônica em micelas de CTAC. O número de ânions iodeto depende da atração da porfirina ou da carga de cabeça polar dos surfactantes.

1.4.3. Estudos espectroscópicos da interação das porfirinas TMPyP e TPPS₄ com micelas puras e micelas mistas.

1.4.3.1. Porfirina catiônica na presença de micelas puras de SDS e na presença de micelas mistas

1.4.3.1.1. Efeito do surfactante neutro TX-100 no agregado pré-micelar TMPyP+SDS

A interação da TPPS₄ e da TMPyP com os surfactantes CTAC e SDS, respectivamente, foi demonstrada pelas modificações nos espectros de absorção ótica, fluorescência e espalhamento de luz ressonante. A adição de surfactante de carga oposta à porfirina modificou a posição, largura e a intensidade das bandas de absorção e de emissão [14-16,19].

Como mencionado anteriormente a titulação espectrofotométrica da TMPyP em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0, em função da concentração de SDS apresentou um equilíbrio de três espécies diferentes em solução. A deconvolução espectral das espécies envolvidas no equilíbrio foi realizada utilizando o método CCA (do inglês “Convex Constraint Analysis”) [91]. A primeira espécie (porfirina livre) foi caracterizada como monômero de porfirina livre em solução. Para uma razão de $[SDS]/[TMPyP]=16$ esta espécie praticamente desaparece em solução, para uma concentração de porfirina de 15.0 μM . A segunda espécie (porfirina ligada I) é caracterizada por um espectro de absorção com a banda de Soret de baixa intensidade e bastante alargada, o que é consistente com observações anteriores sobre a agregação de porfirina [14,15]. O conteúdo deste agregado pré-micelar porfirina/surfactante primeiro aumenta com o aumento da $[SDS]$, atingindo um máximo para a mesma razão $[SDS]/[TMPyP]=16:1$ (0.24 mM/15.0 μM) onde o conteúdo da espécie livre de TMPyP torna-se zero. A partir deste ponto o agregado começa a diminuir em favor da formação da porfirina ligada às micelas (porfirina ligada II). O aumento da concentração de SDS favoreceu a dissociação dos agregados, produzindo a forma monomérica ligada [19].

Estes agregados pré-micelares apresentam um aumento na intensidade de espalhamento, e uma forte supressão de fluorescência. A formação destes agregados depende da razão $[surfactante]/[porfirina]$. A faixa de razão $[SDS]/[TMPyP]$ para a formação de 50 % de agregado está entre 6 e 44, e a máxima formação deste agregado acontece para uma razão de 16:1.

Com o intuito de observarmos se a presença de TX-100 desfavorecia a formação do agregado pré-micelar, foi realizada a titulação da porfirina catiônica TMPyP 15 μM na presença de 0.24 mM de SDS, ou seja uma razão de $[\text{SDS}]/[\text{TMPyP}]$ de 16:1 com concentrações crescentes de TX-100. A composição do sistema misto SDS+TX-100 foi representada por frações molares (X) das diferentes concentrações totais de surfactantes.

A figura 24 mostra que o aumento da concentração de TX-100, ou seja, o aumento da fração molar de TX-100 aumentou a intensidade de absorção. A intensidade de fluorescência aumentou um fator 7 quando comparada ao espectro de emissão do agregado pré-micelar, indicando que provavelmente a TMPyP encontra-se ligada à micela mista (Figura 25). Entretanto, quando comparamos o espectro de emissão do agregado pré-micelar na presença de altas concentrações de TX-100 com o espectro da porfirina livre observamos que a intensidade de fluorescência aumentou um fator 2.8. O mesmo ocorre quando a dissociação do agregado acontece devido à adição de SDS, ou seja, quando a solução é saturada com o surfactante SDS puro a intensidade da fluorescência aumenta apenas um fator 2.5 [19]. Desta forma, observamos que o aumento de rendimento quântico da porfirina monomérica na micela mista é bastante similar do que em SDS puro. Indicando que o fenômeno de dissociação do agregado pela adição de TX-100, é similar ao observado na presença de micelas de SDS pura. Entretanto, ainda podemos observar que nas micelas de SDS pode ocorrer supressão parcial de fluorescência da porfirina pelo surfactante, o que não ocorre ou ocorre em grau menor nas micelas SDS + TX-100. Além disso, os dados de RLS mostraram que com o aumento da concentração de TX-100 a intensidade de espalhamento diminui (Figura 26). Através dos resultados de absorção ótica, fluorescência e RLS observamos que a adição de TX-100 em razões de concentração acima de 20% em relação ao SDS produz a dissociação dos agregados, ou seja, para frações molares $X_{\text{TX-100}} = 0.2$ (Figura 24B, 25, 26B).

A presença de TX-100 nas micelas de SDS faz com este blinde as cargas negativas da cabeça polar do surfactante SDS. Por outro lado, a própria porfirina pode blindar as cargas negativas dos grupos sulfonatos. Neste caso teríamos uma situação de competição entre o surfactante não iônico e a porfirina pelo sítio da superfície da micela aniônica. Assim, podemos concluir que em baixas concentrações de TX-100, a porfirina é capaz de competir pela superfície da micela. Em altas concentrações de TX-100, ou seja, acima de 20% de TX-100, o sistema misto não responde à presença de porfirina, ou seja, desfavorece a formação do agregado. Um estudo

similar realizado sobre a interação de um polímero com micelas mistas de TX-100 e SDS foi desenvolvido por Sharma e colaboradores [92]. Neste trabalho eles observaram que o SDS interage fortemente com o copolímero Pluronic, enquanto o surfactante TX-100 não interage. A interação deste copolímero com micelas mistas de TX-100 + SDS é menor do que com o SDS puro, e diminui ainda mais quando a fração molar de TX-100 aumenta no sistema misto.

Figura 24: (A) Espectros de absorção da TMPyP na presença de 0.24 mM de SDS em função da fração de TX-100 e o espectro da porfirina livre em solução tampão pH 6.0 na ausência de qualquer surfactante (linhas pretas tracejadas); (B) Inserto da região das bandas Q, apresentadas em (A); [TMPyP]=15.0 μ M, tampão acetato-fofato-borato 30 mM pH 6.0.

Figura 25: (A) Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TMPyP na presença 0.24 mM de SDS em função da fração molar de TX-100. A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de TX-100, respectivamente; [TMPyP]=15.0 μ M, tampão acetato-fofato-borato 30 mM pH 6.0.

Figura 26: (A) Efeito do aumento da fração de TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de TMPyP na presença de 0.24 mM SDS em tampão acetato-fofato-borato 30 mM pH 6.0, normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350$ nm, [TMPyP]=15 μ M; (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 468$ nm em função da fração de TX-100.

I.4.3.1.2. Titulação da TMPyP em função da concentração da micela mista 80%SDS+20%TX-100

Um experimento adicional foi realizado da TMPyP em função da concentração da micela mista SDS + TX-100, contendo 80% do surfactante aniônico e 20 % do surfactante neutro, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0. O motivo de termos escolhido a razão de 8:2 (SDS:TX-100), está baseado nos resultados apresentados anteriormente, onde observamos que 20% de TX-100 resolubilizava os agregados pré-micelares de TMPyP+SDS. Os espectros de absorção da titulação da TMPyP em função da concentração da micela mista SDS/TX-100 apresentaram um equilíbrio de três espécies diferentes em solução (Figura 27). A deconvolução espectral das espécies envolvidas no equilíbrio foi realizada utilizando o método CCA [19,20,91]. A espécie I está associada à porfirina monomérica livre em solução. Para uma razão de $[SDS+TX-100]/[TMPyP]=15$ esta espécie praticamente desaparece em solução, para uma concentração de porfirina de 15.0 μM . A segunda espécie (espécie II) é caracterizada por um espectro de absorção com a banda de Soret de baixa intensidade e bastante alargado, o que é consistente com observações anteriores sobre agregados de porfirina [14-16,18-20]. O conteúdo deste agregado pré-micelar porfirina/surfactante primeiro aumenta com o aumento da concentração da mistura SDS+TX-100, atinge um máximo para a mesma razão $[SDS+TX-100]/[TMPyP]=15:1$ (0.225 mM/15.0 μM) onde o conteúdo da espécie livre (espécie I) de TMPyP torna-se zero. A partir deste ponto o agregado começa a diminuir em favor da formação da porfirina ligada às micelas mistas (espécie III). O aumento da concentração de surfactante favoreceu a dissociação dos agregados, produzindo a forma monomérica ligada (Figura 27).

Figura 27: (A) Efeito da concentração da mistura de surfactantes nos espectros de absorção ótica da titulação da TMPyP (15, 0 μM) em função das diferentes concentrações de SDS+TX-100 ($0 < [80\%\text{SDS}+20\%\text{TX-100}] < 4.3 \text{ mM}$) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0, cubeta de caminho ótico 0.5 cm. (B) Deconvolução espectral das espécies envolvidas no equilíbrio: espécie I (monômeros de porfirina livre); espécie II (agregados pré-micelares de porfirina/surfactante); espécie III (monômeros de porfirina ligada às micelas mistas); (C) Frações das espécies puras presentes no equilíbrio em função da [80%SDS+20%TX-100].

Na Figura 28 são apresentados os ajustes dos dados de absorção ótica para avaliar as constantes de associação da porfirina às micelas de SDS puro e da mistura 80%SDS+20% Triton X-100, para a concentração de TMPyP=15μM. O valor das constantes de associação observado através do ajuste do máximo da banda de Soret em 424 nm em função da concentração de surfactante, utilizando a equação de ajuste a seguir (eq. 32) [16,19,20] foi de $(2.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{M}^{-1}$ e $(1.8 \pm 0.1) \times 10^3 \text{M}^{-1}$, para o sistema SDS puro e mistura SDS+TX-100, respectivamente. Os valores encontrados são bastante similares, sugerindo que a blindagem das cargas do SDS pelo surfactante neutro não foi suficiente para reduzir a associação porfirina-micela mista.

$$A = A_f^o + \frac{(A_b^o - A_f^o)}{\frac{1}{K_b([S]_o - cmc)^N} + 1} \quad (32)$$

A = absorvância medida; A_f^o = absorvância da porfirina na ausência de surfactante; A_b^o = absorvância da porfirina ligada ao surfactante; $[S]_o$ = concentração de surfactante; cmc = concentração micelar crítica; N = ligação estequiométrica unitária; K_b = constante de associação

Figura 28: Curvas de titulação de absorção ótica para a determinação da constante de associação da TMPyP às diferentes micelas. (A) em função da [SDS]; (B) em função da [SDS+TX-100].

A figura 29A apresenta os espectros de espalhamento de luz ressonante da TMPyP em função da concentração da micela mista 80%SDS+20%TX-100 em tampão pH 6.0. A intensidade de espalhamento de luz na região de 400-500 nm primeiro aumenta dramaticamente devido à adição da mistura de surfactante (efeito de RLS) e em seguida diminui novamente quando a [SDS+TX-100] é aumentada. Os agregados pré-micelares formados com a TMPyP na presença

da micela mista SDS + TX-100 apresentam um aumento na intensidade de espalhamento, como podemos observar na figura 29, assim como os agregados de TMPyP + SDS puro. O máximo de RLS é deslocado para a região do vermelho quando comparado com os espectros de absorção e de fato pode ser mencionado que a banda de Soret alargada observada para a espécie II (os agregados pré-micelares) tem uma componente ao redor de 460 nm. A intensidade de espalhamento em 460 nm em função da concentração de [SDS+TX-100] é mostrada na figura 29B. O máximo aumento na intensidade de espalhamento de luz é observada para a razão $[SDS+TX-100]/[TMPyP] = 10 - 27$ o que é próximo à razão característica para a faixa de 50% de formação de agregados, ou para o máximo conteúdo da espécie II da TMPyP determinada dos dados de absorção ótica (Figura 27). A faixa de 50% de formação do agregado é obtida, do gráfico da intensidade de espalhamento em função da [SDS+TX-100] (Figura 29B), tomando-se os valores de concentração de surfactante, na posição da largura a meia altura de ambos os lados da curva.

Portanto, podemos atribuir à espécie II a uma forma agregada da porfirina com as moléculas de SDS+TX-100. Esta espécie é formada após a ligação da porfirina com a mistura de surfactante, quando a concentração de SDS+TX-100 é relativamente baixa (o máximo dos agregados ocorre para 0.15 – 0.40 mM de (80%SDS+20%TX-100) em presença de 15.0 µM de porfirina). Após o aumento da concentração de surfactantes os agregados se decompõem em favor da espécie III (porfirina monomérica ligada), o qual leva a uma dramática diminuição na intensidade de espalhamento de luz da solução.

Quanto à natureza do agregado se é do tipo J- ou H- é difícil definir de forma clara, pois apesar de observamos um deslocamento para a região do vermelho da espécie agregada, este deslocamento não é muito intenso. Além disso, temos a contribuição da mudança do meio da solução aquosa para um meio micelar hidrofóbico que poderia contribuir para deslocamentos de picos espectroscópicos.

Todavia, como já foi mencionado anteriormente a porfirina tetracatiônica TMPyP não se autoagrega em solução aquosa, nem mesmo forma dímeros. Sendo assim, toda a intensidade de espalhamento de luz ressonante é proveniente dos agregados pré-micelares porfirina-surfactante.

Figura 29: (A) Efeito do aumento da concentração da micela mista SDS+TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de TMPyP em tampão acetato-fofato-borato 30 mM pH 6.0, normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350 \text{ nm}$, $[TMPyP]=15\mu\text{M}$; (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 460 \text{ nm}$ em função da $[80\%SDS+20\%TX-100]$.

A análise dos espectros de emissão da titulação da TMPyP com concentrações crescentes da mistura de surfactante SDS+ TX-100 no pH 6.0 (dados não mostrados) mostrou resultados semelhantes aos apresentados para a porfirina catiônica em função da concentração de SDS puro. Observamos que para uma determinada faixa de concentração de surfactante ocorre uma pequena supressão de fluorescência (Figura 30), confirmando a presença de agregados pré-micelares. É importante mencionar que para o sistema TMPyP + SDS esta supressão de fluorescência devido à formação de agregados pré-micelares é bem mais acentuada, como podemos observar na figura 31. Como mencionado anteriormente a espécie agregada apresenta uma intensidade de fluorescência bastante reduzida, sendo que o mínimo da integral de fluorescência (A)

corresponde ao máximo conteúdo dessa espécie (espécie II dos dados de absorção ótica). A intensidade de fluorescência é recuperada quando a solução é saturada com o surfactante SDS e aumenta a intensidade por um fator 2.5, sendo que para o sistema SDS+TX-100 a intensidade aumenta por um fator 3.

Figura 30: Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TMPyP em função da concentração da micela mista 80%SDS+20%TX-100. A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de micela mista, respectivamente; [TMPyP]=15.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0.

Figura 31: Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TMPyP em função da concentração de SDS puro (em preto) e da micela mista 80%SDS+20%TX-100 (em vermelho). A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de surfactante, respectivamente; [TMPyP]=15.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 6.0.

1.4.3.1.3. Discussão geral da porfirina catiônica na presença de micelas puras de SDS e na presença de micelas mistas.

A porfirina catiônica TMPyP em presença de concentrações baixas do surfactante aniônico SDS apresenta a formação de agregados, monitorados por absorção ótica, fluorescência e espalhamento de luz ressonante [19]. A adição de surfactante não-iônico, TX-100, leva à redução deste efeito de agregação monitorado pelas diferentes técnicas espectroscópicas utilizadas neste trabalho. Na faixa de concentração de surfactante onde ocorre a agregação os espectros são bastante sensíveis aos tempos entre a preparação e a medida, indicando a existência de uma cinética relativamente lenta de agregação e desagregação. Nas condições em que o máximo de agregado é formado aparentemente a proporção SDS:TX-100 igual a 80:20 não é suficiente para eliminar totalmente a agregação apesar da redução significativa do efeito de supressão de fluorescência e da intensidade de luz espalhada.

É importante mencionar que a mistura de surfactantes pode formar agregados micelares mistos. O comportamento destas misturas é bem diferente comparado ao das micelas simples de surfactantes puros. Por outro lado, no caso de imiscibilidade total ocorreria a coexistência de dois tipos de micelas, cada uma consistindo de um único surfactante. A presença simultânea de dois tipos de micelas mistas com composições diferentes seria também possível, representando uma transição entre as duas alternativas mencionadas acima. Vários estudos sobre as propriedades de micelas mistas de surfactante têm sido realizados [92-95]. A adição de surfactante iônico a um surfactante não iônico em solução pode reduzir significativamente a cmc da mistura e aumentar o tamanho das micelas. O Triton X-100 (TX-100) é um surfactante não iônico largamente usado em muitos processos bioquímicos e químicos, sendo o surfactante não iônico escolhido em muitos estudos de micelas mistas. Existem evidências da solubilização de moléculas de SDS no núcleo hidrofóbico de micelas de TX-100, e de que a cadeia hidrofóbica do SDS não fica estendida na micela mista. Existe ainda uma proposta de que a cabeça polar de SDS não fique totalmente exposta ao solvente quando inserida na micela de TX-100 [95]. Entretanto a estrutura e o tamanho destas micelas mistas permanecem ainda não esclarecidos. Um trabalho desenvolvido por Charlton e colaboradores [96] relata que a adição de um eletrólito (no caso o KCl) nas micelas de TX-100, modifica a estrutura da micela, mudando a sua forma de um elipsóide oblato para um elipsóide prolato.

De acordo com Shiloach e Blankschtein [93] a presença de uma pequena fração ($\alpha=0.1$) de surfactante iônico SDS na micela neutra de TX-100, diminuiu a área por molécula de surfactante e aumentou o número de agregação. Isto deve-se à pequena cabeça polar do SDS que reduz a repulsão estérica da micela de TX-100. Em contraste, para uma fração de $\alpha_{\text{SDS}}=0.3$, a repulsão eletrostática entre as cargas da cabeça polar do SDS é forte o bastante para não permitir o crescimento micelar.

Durante o desenvolvimento deste projeto de doutorado foram realizadas algumas medidas de SAXS envolvendo micelas mistas de TX-100 com surfactantes aniônicos e catiônicos, na ausência e na presença de porfirinas. Através de análises preliminares das curvas de SAXS das micelas de TX-100 + SDS observamos um pequeno aumento no raio parafínico das micelas de TX-100 na presença de pequenas quantidades de SDS. Isto pode ser atribuído ao fato de ocorrer a inserção de monômeros de surfactante dentro da micela de TX-100 e ao fato de modificar a densidade de carga da superfície levando a uma repulsão intermicelar. A adição de SDS nas micelas de TX-100 provavelmente leva a um aumento da densidade de carga da superfície, devido ao fato de que os grupos sulfatos carregados são localizados entre o centro micelar e a interface com a água. Entretanto, estes resultados encontram-se ainda em fase de análise e serão futuramente concluídos.

1.4.3.2. Porfirina aniônica na presença de micelas puras de CTAC e na presença de micelas mistas

1.4.3.2.1. Efeito do surfactante neutro TX-100 no agregado pré-micelar TPPS₄-CTAC

A TPPS₄ na presença de micelas catiônicas de CTAC apresenta um equilíbrio complexo entre três diferentes espécies em solução: uma espécie monomérica livre e duas espécies ligadas. Uma espécie ligada corresponde a agregados pré-micelares de porfirina-surfactante e a outra a porfirina monomérica ligada às micelas. Estes experimentos foram realizados nos pHs 3.0 e 7.5 a fim de se estudar a TPPS₄ na sua forma protonada e deprotonada [16]. Nas condições dos experimentos de absorção ótica, a agregação da TPPS₄ foi induzida pelo CTAC para concentrações relativamente baixas de surfactante (0.01 – 0.1 mM) [16]. Isto porque a razão de [CTAC]/[TPPS₄] para que tenhamos a máxima formação do agregado porfirina/surfactante é de

4:1 e 12:1 nos pHs 3.0 e 7.5, respectivamente. Estes agregados exibem um forte efeito de RLS e são formados devidos à interação da porfirina com o CTAC em concentrações bem abaixo da concentração micelar crítica na região micromolar (a cmc do CTAC é 1mM em solução aquosa).

Quando a concentração do surfactante aumenta os agregados pré-micelares são dissolvidos nas micelas o que leva a uma drástica redução na intensidade de espalhamento de luz e um aumento da intensidade de fluorescência. Para observarmos se a presença de TX-100 desfavorecia a formação do agregado pré-micelar, foi realizada a titulação da porfirina aniônica TPPS₄ 30 µM na presença de 0.12 mM de CTAC, ou seja, uma razão de [CTAC]/[TPPS₄] de 4:1 com concentrações crescentes de TX-100 no pH 3.0. A composição do sistema misto CTAC-TX-100 foi representada por frações molares (X) do TX-100 em relação às diferentes concentrações totais de surfactantes.

A figura 32 mostra que a adição de TX-100, ou seja, o aumento da fração molar de TX-100 aumentou a intensidade de absorção. Na figura 32A temos apresentado o espectro da TPPS₄ em solução aquosa pura, ao compararmos o espectro da porfirina livre com o espectro final da titulação da TPPS₄ na presença de 0.12mM em função da concentração de TX-100, observamos claramente que os espectros são diferentes, e que a porfirina ligada às micelas mistas apresenta o espectro deslocado para o azul. Na figura 32C observamos que a intensidade de absorção em 420 nm primeiro aumenta devido a adição de TX-100 e a partir da fração de TX-100 igual a 0.4 (ou seja, 40% de TX-100 em relação ao CTAC) a intensidade diminui drasticamente e ao mesmo tempo começamos a observar a formação da banda em 710 nm (característica de agregados J) [8,71,75].

A adição de TX-100 aos agregados pré-micelares apresentou um aumento de 9 vezes na intensidade de fluorescência, considerando o A₀ como sendo a área do espectro de emissão do agregado pré-micelar TPPS₄-CTAC. Este resultado indica provavelmente a solubilização do agregado pré-micelar com a adição de TX-100, e que a TPPS₄ encontra-se ligada às micelas mistas (Figura 33A e B). Entretanto, a intensidade de fluorescência do agregado pré-micelar TPPS₄-CTAC solubilizado devido a adição de TX-100 aumentou apenas um fator 0.5 em relação à porfirina livre em solução (Figura 33C). Este valor está muito próximo do valor encontrado, quando ocorre a dissociação do agregado pré-micelar pela adição de CTAC puro. Quando a solução de agregado TPPS₄-CTAC é saturada com o surfactante CTAC a intensidade da

fluorescência aumenta apenas um fator 0.4 para a concentração de TPPS₄ de 8 µM em tampão acetato-fosfato pH 3.0 [16].

Os dados de RLS mostraram que com o aumento da concentração de TX-100 a intensidade de espalhamento diminuiu (Figura 34). O máximo de espalhamento em 507 nm em função da fração molar de TX-100 (Figura 34B) mostrou que quando esta fração é igual a 0.4 ocorre uma diminuição significativa da intensidade de espalhamento. Observamos que o espectro de absorção da espécie ligada de porfirina à micela pura de CTAC é bastante similar ao espectro obtido da porfirina ligada à micela mista CTAC+TX-100.

Resultados similares foram observados para os agregados pré-micelares de TPPS₄ na presença de 0.36 mM de CTAC em função da concentração de TX-100 em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.5. Na figura 35 observamos através dos espectros de absorção ótica que o aumento da fração de TX-100 desfavorece a formação do agregado pré-micelar. O espectro de absorção da porfirina ligada às micelas mistas (CTAC+TX-100) apresenta-se ligeiramente deslocado para o vermelho. Para a fração de TX-100 igual a 0.5 observamos um aumento drástico na intensidade de absorção devido a solubilização dos agregados (Figura 35B). De acordo com os dados de fluorescência observamos que a adição de TX-100 aos agregados pré-micelares de TPPS₄-CTAC aumentou a intensidade de fluorescência de um fator 12 em relação ao agregado pré-micelar, e a intensidade de fluorescência aumentou um fator 1.2 em relação a porfirina livre em solução (Figura 36). Através dos dados de RLS, observamos uma drástica redução na intensidade de espalhamento devido a adição de TX-100 aos agregados de TPPS₄-CTAC (Figura 37). Para a fração de TX-100 = 0.5 ocorre uma diminuição significativa na intensidade de espalhamento (Figura 37B).

Assim, através dos resultados de absorção ótica, fluorescência e RLS para ambos os valores de pH observamos que a adição de TX-100 em razões de concentração acima de 40% em relação ao CTAC produz a dissociação parcial dos agregados pré-micelares, ou seja, para frações molares $X_{TX-100} = 0.4$. Assim a presença de 40% de TX-100 no sistema misto CTAC+TX-100 desfavorece a formação do agregado porfirina-surfactante. Quando comparamos estes resultados com os obtidos da TMPyP com o sistema micelar misto SDS-TX-100 observamos que para desfavorecer a formação do agregado entre o par TPPS₄ e CTAC precisamos de uma maior concentração de TX-100, o que pode ser justificado pela maior constante de associação da

porfirina aniônica com o surfactante catiônico, que é pelo menos 10 vezes maior do que a constante obtida da porfirina catiônica com o SDS [16,19].

Figura 32: (A) Espectros de absorção ótica da TPPS₄ na presença de 0.12 mM de CTAC em função da fração de TX-100 e o espectro da porfirina livre em solução tampão pH 3.0 na ausência de qualquer surfactante (linha preta tracejada); (B) Inserto da região das bandas Q, apresentadas em (A); [TPPS₄]=30.0 μM, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 3.0. (C) Absorbâncias correspondentes aos espectros apresentados em (A) no comprimento de onda de 420 e 710 nm.

Figura 33: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TPPS₄ na presença de 0.12 mM de CTAC em função da fração molar de TX-100; (B) e (C) Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TPPS₄ na presença de 0.12 mM de CTAC em função da fração molar de TX-100. A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de TX-100, respectivamente. [TPPS₄]=30.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 3.0.

Figura 34: (A) Efeito do aumento da fração de TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de 30 μM TPPS_4 na presença de 0.12 mM de CTAC em tampão acetato-fofato-borato 30 mM, pH 3.0, normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350$ nm (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 507$ nm em função da fração de TX-100.

Figura 35: (A) Espectros de absorção da TPPS₄ na presença de 0.36 mM de CTAC em função da fração de TX-100 e o espectro da porfirina livre em solução tampão pH 7.5 na ausência de qualquer surfactante (linha preta tracejada); [TPPS₄]=30.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.5.

Figura 36: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TPPS₄ na presença de 0.36 mM de CTAC em função da fração molar de TX-100; (B) Integral de fluorescência dos espectros normalizados (A/A_0) da TPPS₄ na presença de 0.36 mM de CTAC em função da fração molar de TX-100. A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de TX-100, respectivamente. [TPPS₄]=30.0 μ M, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.5.

Figura 37: (A) Efeito do aumento da fração de TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de 30 μM TPPS₄ na presença de 0.36 mM de CTAC em tampão acetato-fofato-borato 30 mM, pH 7.5, normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350$ nm (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 450$ nm em função da fração de TX-100.

1.4.3.2.2. Titulação da TPPS₄ em função da concentração da micela mista 60%CTAC + 40%TX-100.

Para complementar os dados apresentados anteriormente foi realizado um experimento adicional de titulação da TPPS₄ em função da concentração da micela mista de CTAC+TX-100, contendo 60% de surfactante catiônico e 40% do surfactante neutro, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 3.0. A escolha da razão de 6:4 (CTAC:TX-100), está baseada nos resultados apresentados anteriormente, onde observamos que cerca de 40% de TX-100 resolubilizava os agregados pré-micelares de TPPS₄+CTAC.

A variação espectral da titulação da TPPS₄ no pH 3.0 no tampão acetato-fosfato-borato 30 mM em função da [60%CTAC+40%TX-100], acompanhada através de absorção ótica apresentou um equilíbrio de várias espécies, como mostrado na figura 38. A análise do conjunto de espectros da Figura 38 foi realizada pelo método de CCA [19,20,91], sendo que todo este conjunto de espectros foi decomposto em três componentes. Dessa forma, três espécies diferentes foram obtidas dependendo da concentração da mistura de surfactante presente no equilíbrio, cujos espectros puros são apresentados na figura 38B.

A espécie I está associada à porfirina monomérica livre em solução. Podemos dizer que a porfirina se encontra na sua forma monomérica, devido ao fato da concentração ser baixa (5μM), apesar da solução esta no pH ácido. Para uma razão de [CTAC+TX-100]/[TPPS₄]= 24, esta espécie praticamente desaparece em solução, para uma concentração de surfactante de 0.12 mM e concentração de porfirina de 5μM. A segunda espécie (espécie II) é caracterizada por um espectro de absorção com a banda de Soret de baixa intensidade e bastante alargado, o que é consistente com observações anteriores sobre agregados de porfirina [14-16,18-20]. A presença de picos em 490 e 705 nm é consistente com a presença de agregados J (Figura 39). O conteúdo deste agregado pré-micelar porfirina/surfactante primeiro aumenta com o aumento da concentração da mistura CTAC+TX-100, atinge um máximo para a mesma razão [CTAC+TX-100]/[TMPyP]=24:1 (0.12 mM/5.0 μM) onde o conteúdo da espécie livre (espécie I) de TPPS₄ torna-se zero. A partir deste ponto o agregado começa a diminuir em favor da formação da porfirina ligada às micelas mistas (espécie III). O aumento da concentração de surfactante favoreceu a dissociação dos agregados, produzindo a forma monomérica ligada (Figura 38).

Figura 38: (A) Efeito da concentração da mistura de surfactantes nos espectros de absorção ótica da titulação da TPPS₄ (5 μM) em função das diferentes concentrações de CTAC+TX-100 (0 < [60%CTAC+40%TX-100] < 3.0 mM) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 3.0. (B) Deconvolução espectral das espécies envolvidas no equilíbrio: espécie I (monômeros de porfirina livre); espécie II (agregados pré-micelares de porfirina/surfactante); espécie III (monômeros de porfirina ligada às micelas mistas); (C) Frações das espécies puras presentes no equilíbrio em função da [60%CTAC+40%TX-100].

Figura 39: Máximos de intensidade de absorção em 434 nm (A), 490 nm (B) e 705 nm(C) obtidos das curvas da Figura 38A.

Na Figura 40 está apresentado um ajuste dos dados de absorção ótica para avaliar a constante de associação da porfirina à micela mista de 60%CTAC+40%TX-100, para a concentração de TPPS₄=5μM. O valor da constante de associação observado através deste ajuste do máximo da banda de Soret em 419 nm em função da concentração de surfactante, utilizando a equação de ajuste (eq. 32) descrita anteriormente [16,19,20] foi de $(3.5 \pm 0.3) \times 10^3 \text{M}^{-1}$. Este valor é cerca de 3 vezes menor do que o valor encontrado para o sistema TPPS₄ + CTAC no pH 3.0. Este resultado sugere que a presença de TX-100 dificulta a formação do par iônico TPPS₄ + CTAC, desfavorecendo a associação porfirina-surfactante. Entretanto, apesar da constante de associação ser menor, a presença do TX-100 para esta razão não foi suficiente para reduzir de forma drástica a associação da porfirina com a micela mista.

Figura 40: Curva de titulação das absorvâncias em 419 nm obtidas das curvas da Figura 38A para a determinação da constante de associação da TPPS₄ à micela mista 60%CTAC+40%TX-100.

A figura 41 apresenta os espectros de espalhamento de luz ressonante da TPPS₄ em função da concentração da micela mista 60%CTAC+40%TX-100 em tampão pH 3.0. A intensidade de espalhamento de luz na região de 450-550 nm primeiro aumenta dramaticamente devido à adição da mistura de surfactantes (efeito de RLS) e em seguida diminui novamente quando a [CTAC+TX-100] é aumentada. Os agregados pré-micelares formados com a TPPS₄ na presença da micela mista CTAC + TX-100 apresentam um aumento na intensidade de espalhamento, como podemos observar na figura 41B, assim como os agregados de TPPS₄ + CTAC puro. O máximo de RLS é deslocado para a região do vermelho quando comparado com os espectros de absorção e de fato pode ser mencionado que a banda de Soret alargada observada para a espécie II (os agregados pré-micelares) tem uma componente ao redor de 490 nm. A intensidade de espalhamento em 502 nm em função da concentração de [CTAC+TX-100] é mostrada na figura 41B. O máximo aumento na intensidade de espalhamento de luz é observado para a razão [CTAC+TX-100]/[TMPyP] = 8 – 70 o que é próximo à razão característica para a faixa de 50% de formação de agregados, ou para o máximo conteúdo da espécie II da TPPS₄ determinada dos dados de absorção ótica (Figura 38). A faixa de 50% de formação do agregado é obtida, do gráfico da intensidade de espalhamento em função da [CTAC+

TX-100] (Figura 41B), tomando-se os valores de concentração de surfactante, na posição da largura a meia altura de ambos os lados da curva.

Portanto, nós podemos atribuir à espécie II uma forma agregada da porfirina com as moléculas de CTAC+TX-100 que é formada após a ligação da porfirina com a mistura de surfactante, quando a concentração de CTAC+TX-100 é relativamente baixa (o máximo dos agregados ocorre para 0.04 – 0.40 mM de (60%CTAC+40%TX-100) em presença de 5.0 μ M de porfirina). Após o aumento da concentração de surfactantes os agregados se decompõem em favor da espécie III (porfirina monomérica ligada), o qual leva a uma dramática diminuição na intensidade de espalhamento de luz da solução.

Quanto á natureza do agregado pré-micelar (espécie II da Figura 38B), podemos dizer de acordo com os nossos dados que estes são do tipo J-. Observamos um deslocamento para a região do vermelho, com um surgimento de uma banda em 490 e 705 nm para a faixa de concentração onde ocorre a máxima formação de agregados pré-micelares TPPS₄-CTAC. Estes resultados parecem ser diferentes para os resultados encontrados para o CTAC puro [16]. Porém este deslocamento de picos espectroscópicos para o vermelho pode também ser devido á contribuição da mudança do meio da solução aquosa para um meio micelar hidrofóbico. Além disso, a porfirina aniônica pode se auto-agregar em solução aquosa [75]. Sendo assim, a intensidade de espalhamento de luz ressonante pode ser proveniente dos agregados pré-micelares porfirina-surfactante e dos autos-agregados de TPPS₄.

Um dado interessante a ser observado é que os espectros de RLS da porfirina em função da concentração da micela mista (60%CTAC+40%TX-100) em pH 3.0 são bem diferentes dos espectros de espalhamento de luz ressonante observado para a TPPS₄ na presença de micelas puras de CTAC em pH 3.0 [16], e principalmente aos espectros de RLS obtidos para a TPPS₄ na presença de micelas mistas no pH 7.5 (Figura 37).

Figura 41: (A) Efeito do aumento da concentração da micela mista 60%CTAC+40%TX-100 nos espectros de RLS nas soluções de TPPS₄ em tampão acetato-fofato-borato 30 mM pH 3.0, normalizada pelo tampão puro em $\lambda = 350$ nm, [TPPS₄]=5μM; (B) Intensidade de espalhamento de luz em $\lambda = 502$ nm em função da [60%CTAC+40%TX-100].

A análise dos espectros de emissão da titulação da TPPS₄ com concentrações crescentes da mistura de surfactante CTAC+ TX-100 no pH 3.0 (dados não mostrados) mostrou resultados semelhantes aos apresentados para a porfirina aniônica em função da concentração de CTAC. Observamos que para uma determinada faixa de concentração de surfactante ocorre supressão de fluorescência significativa (Figura 42), confirmando a presença de agregados pré-micelares. É importante mencionar que para o sistema TPPS₄ + CTAC a máxima formação do agregado está deslocada para concentração menor de surfactante quando comparada com o sistema TPPS₄ na

presença da mistura de surfactante misto. Como mencionado anteriormente, a espécie agregada apresenta uma intensidade de fluorescência bastante reduzida, sendo que o mínimo da integral de fluorescência (A) corresponde ao máximo conteúdo dessa espécie (espécie II na análise de dados de absorção ótica). A intensidade de fluorescência é recuperada parcialmente quando a solução é saturada com o surfactante CTAC aumentando até cerca de um fator 0.5 quando comparada com a fluorescência da porfirina em tampão. Sendo que para o sistema CTAC+TX-100 a intensidade aumenta até cerca de um fator 0.7 comparada com a fluorescência inicial na ausência de surfactante.

Figura 42: Integral de fluorescência obtida das áreas dos espectros de emissão normalizados (A/A_0) da TPPS₄ em função da concentração de CTAC puro (em preto) e da micela mista 60%CTAC+40%TX-100 (em vermelho). A e A_0 são as integrais de fluorescência na presença e na ausência de surfactante, respectivamente; [TPPS₄]=5.0 μ M, tampão acetato-fofato-borato 30 mM pH 3.0.

1.4.3.2.3. Discussão geral da porfirina aniônica na presença de micelas puras de CTAC e na presença de micelas mistas.

A porfirina aniônica TPPS₄ na presença de concentrações baixas do surfactante catiônico CTAC apresenta a formação de agregados, monitorados por absorção ótica, fluorescência e espalhamento de luz ressonante [16]. A adição de surfactante não-iônico, TX-100, leva à redução deste efeito de agregação monitorado pelas diferentes técnicas espectroscópicas utilizadas neste trabalho. Observamos também que na faixa de concentração de surfactante onde temos a formação destes agregados pré-micelares os espectros são bastante sensíveis aos tempos entre a preparação da amostra e a medida, indicando a existência de uma cinética relativamente lenta de agregação e desagregação.

Nas condições em que o máximo de agregado é formado para ambos os valores de pH, 3.0 e 7.5, aparentemente a proporção de CTAC:TX-100 igual a 60:40 não é suficiente para eliminar totalmente a agregação. Entretanto, observamos que a presença do TX-100 diminui a constante de associação entre a porfirina e o surfactante, quando comparada com a interação com CTAC puro, dificultando a formação do par iônico CTAC-TPPS₄.

A auto-agregação entre uma mistura de um surfactante catiônico, brometo tetradeciltrimetilamonio (TTAB), e um surfactante neutro, polioxietileno 23 lauril éter (Brij-35), em meio aquoso foi estudado por Sharma e colaboradores [97]. Neste estudo os autores observaram que a temperatura de Kraft do TTAB decresce com o aumento do surfactante neutro no sistema misto, o qual indica que a presença do Brij-35 aumenta a solubilidade do TTAB. Os agregados micelares mistos formados por estes sistemas apresentam um raio hidrodinâmico maior do que a micela formada por um único surfactante. Em estudos similares [92,94,96] foi observado que as interações atrativas entre os constituintes de micelas mistas têm sido explicadas com base nas interações hidrofóbicas. Assim a interação hidrofóbica entre o surfactante neutro e o catiônico pode justificar a menor constante de associação entre a porfirina aniônica e a micela mista de CTAC+TX-100.

Estudos preliminares de micelas mistas de CTAC + TX-100 na presença e na ausência de TPPS₄ foram realizados através da técnica de SAXS. A análise qualitativa destes resultados sugere que no sistema misto CTAC+TX-100 podemos ter a formação de três tipos de micelas: micelas ricas em CTAC, micelas ricas em TX-100 e micelas mistas de CTAC+TX-100. Isto pode

justificar o fato de que no experimento de titulação da TPPS₄ em função da concentração da mistura de surfactantes (60%CTAC+40%TX-100) ainda permanece a observação da formação de um agregado pré-micelar. O qual tudo indica ser um agregado do tipo J-. Ou seja, na presença de micelas mistas a porfirina poderia formar agregados do tipo J- na superfície micelar. Pretendemos futuramente dar continuidade a estes estudos, afim de esclarecer de forma mais clara a formação e a estrutura destes agregados pré-micelares, assim como caracterizar a forma e o tamanho das micelas mistas de CTAC+TX-100 e SDS+TX-100 na presença e ausência de porfirinas aniônicas e catiônicas.

1.4.3. Interação de TMPyP com vesículas de fosfolípídeo: um estudo por fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo.

1.4.3.1. Interação entre a TMPyP com diferentes vesículas de fosfolípídios

Após verificar algumas propriedades da porfirina TMPyP na presença de micelas mistas, experimentos envolvendo a interação desta porfirina com vesículas de fosfolípídeo foram realizados. Sabe-se que as membranas biológicas são formadas por uma mistura de fosfolípídeos, sendo eles zwitteriônicos, aniônicos e/ou catiônicos. Através de estudos anteriores sabemos que a TMPyP apresenta um caráter hidrofóbico menor do que porfirina aniônica TPPS₄. Então para verificarmos que a interação da TMPyP com modelos de membranas biológicas se dá praticamente por interações eletrostáticas, realizamos um estudo da TMPyP em função da concentração de POPC puro, um lipídeo zwitteriônico, e também em função da concentração de POPG puro (aniônico) e da mistura lipídica POPC+POPG. A temperatura utilizada neste estudo foi 25°C, devido ao fato destes lipídeos saturados apresentarem uma temperatura de transição de fase de próximo de 0°C. Ou seja, todos os nossos estudos envolvendo estes lipídeos saturados foram realizados acima de sua transição de fase. Estes experimentos de fluorescência foram realizados num espectrofluorímetro Hitachi F-4500.

Assim, foram realizadas titulações da TMPyP em função da concentração de POPC, POPG e da mistura POPC+POPG para diferentes razões POPG/POPC, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.0. Na figura 43 está apresentada a estrutura química dos lipídeos utilizados neste estudo. Para realizar os estudos de associação da porfirina com os lipídeos, as

soluções de porfirina de concentração fixa foram tituladas com uma solução estoque de LUV's com uma concentração de lipídeo total de 6 mM. A faixa de concentração utilizada de lipídeo foi de 0 - 3 mM, deixando a amostra 10 minutos em repouso antes da realização da medida. Este tempo foi definido através dos espectros de emissão de fluorescência, onde observamos que após 10 min não ocorreram mudanças espectrais significativas no espectro de emissão da porfirina.

Na titulação da porfirina catiônica TMPyP com o lipídeo neutro POPC não foram observadas mudanças significativas nos espectros de emissão de fluorescência, apresentando-se sempre como uma única espécie em solução, sugerindo que não ocorre interação da TMPyP com POPC ou que a interação é pequena (Figura 44). O espectro de emissão da TMPyP em solução aquosa apresenta uma banda intensa em 652 nm. O aumento na intensidade de fluorescência da TMPyP na presença de POPC entre 600 -620 nm é devido ao espalhamento proveniente do lipídio POPC. Apesar de termos descontado o espectro de emissão do lipídeo puro do espectro da TMPyP+fosfolipídio, não foi possível descontar todo o espalhamento proveniente das vesículas.

Através de resultados obtidos por nosso grupo descritos anteriormente [16,19], e também por diferentes pesquisadores [14,15], sabemos que a porfirina aniônica TPPS₄ apresenta um caráter hidrofóbico muito maior do que a TMPyP. Estudos preliminares realizados com a TPPS₄ na presença do lipídeo zwitteriônico POPC apresentaram pequenas mudanças nos espectros de emissão de fluorescência, sugerindo uma pequena interação entre ambos (dados não mostrados). A porfirina aniônica apresenta valores de constante de associação com o surfactante HPS semelhantes aos do CTAC [16]. Isso indica que para esta porfirina o fator hidrofóbico é muito importante, e que não só as forças eletrostáticas estariam envolvidas no equilíbrio porfirina-surfactante. A justificativa para a diferença entre os altos valores de K_b encontrados para a TPPS₄ com as micelas zwitteriônicas de HPS e neutras de TRITON X-100, em relação aos encontrados para a TMPyP com os mesmos surfactantes, pode-se basear no fato de que a porfirina aniônica apresenta um caráter hidrofóbico maior, o que leva a um aumento da interação com estes surfactantes. Sendo assim, os resultados obtidos da interação das porfirinas TMPyP e TPPS₄ com o lipídeo zwitteriônico, realmente sugerem a maior hidrofobicidade da TPPS₄ em relação à porfirina catiônica.

1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicero-3-fosfocolina (Sal de sódio) (POPC) 1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (Sal de sódio) (POPG) **Figura 43:** Estruturas dos lipídeos utilizados neste estudo.

Para evidenciarmos o papel crucial da força eletrostática na interação entre as porfirinas e as vesículas, propomos fazer experimentos preparando misturas lipídicas utilizando o lipídeo zwiteriônico, e diferentes proporções de lipídeo aniônico. Até o presente momento foram realizados experimentos com lipídeo zwiteriônico (POPC) + aniônico (POPG) com a porfirina catiônica (TMPyP), sendo que futuramente pretendemos usar a mistura entre o lipídeo catiônico DOTAP (1,2-Dioleoil-3-Trimetilamonio-Propano (DOTAP)) e o lipídeo POPC com a porfirina aniônica (TPPS₄).

Figura 44: Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP (5.0 μM) em função da concentração de POPC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.0, $\lambda_{\text{exc}} = 515$ nm.

Experimentos com a mistura lipídica POPC + POPG, contendo 10, 20, 30 e 40% de POPG, mostraram que o aumento da porcentagem de POPG favorece a interação entre a porfirina catiônica e a mistura lipídica. A presença de 10% POPG na mistura lipídica POPC+POPG não favorece a interação com a porfirina TMPyP. Os espectros de emissão de fluorescência não apresentaram nenhuma mudança significativa (dados não mostrados). Na Figura 45 podemos observar que quanto maior a porcentagem de carga aniônica na mistura lipídica, maior é a intensidade do espectro de emissão. A adição da mistura lipídica aumenta a intensidade do espectro de emissão, com uma banda intensa em 652 nm e uma segunda banda menor (ombro) em 710 nm, confirmando a interação da porfirina catiônica com a mistura POPC+POPG. O espectro de emissão da TMPyP na presença das misturas lipídicas são bastante similares aos espectros de emissão da TMPyP nas micelas de SDS e micelas mistas de SDS+TX-100.

Através do ajuste do gráfico de A/A_0 em função da [POPC+POPG] obtivemos os valores da constante de associação utilizando a equação a seguir [98]:

$$\frac{A}{A_0} = 1 + \frac{A_{\max}}{A_0} \left(\frac{K_b [L]}{1 + K_b [L]} \right) \quad (33)$$

Onde A e A₀ são as áreas dos espectros de emissão na presença de lipídeo e na ausência de lipídeo, respectivamente. [L] é a concentração de lipídeo e K_b é a constante de associação. A_{max} é a área máxima obtida em alta concentração de lipídeo.

A Figura 45B apresenta os ajustes obtidos através da eq.(33). O aumento da porcentagem de POPG na mistura lipídica aumenta a constante de associação, como podemos verificar na Tabela 7. Um experimento da TMPyP em função da concentração de POPG puro foi realizado (Figura 46). Observamos que a constante de associação entre a TMPyP-POPG é muito maior que nas misturas lipídicas. Para que o sistema seja saturado, ou seja, para que não ocorra mais mudanças significativas nos espectros de emissão da TMPyP na presença de fosfolipídeo, observamos que a concentração de POPG utilizada é muito menor do que para os sistemas mistos POPC+POPG. Assim, a presença do lipídio zwitteriônico diminui a associação entre a porfirina e a mistura lipídica.

Assim, observamos que a interação entre a TMPyP e vesículas de fosfolipídios se dá praticamente por interações eletrostáticas. Apesar de a porfirina interagir com estes modelos não observamos a formação de agregados TMPyP-fosfolipídeos, como foi caracterizado para as porfirinas TMPyP e TPPS₄ com surfactantes de cargas opostas, ou mesmo com mistura de surfactantes SDS+TX-100 e CTAC+TX-100, respectivamente.

Figura 45: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP (5.0 μ M) em função das diferentes concentrações de 70%POPC+30%POPG ($0 < [\text{POPC}+\text{POPG}] < 3$ mM) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.0, $\lambda_{\text{exc}} = 515$ nm. (B) Fluorescência total normalizada (A/A_0) em função da [POPC+POPG] para diferentes razões de POPC:POPG. A e A_0 são as integrais dos espectros de emissão de fluorescência na presença e na ausência de lipídeo, respectivamente. As linhas cheias correspondem aos ajustes dos pontos experimentais pela eq. (33).

Figura 46: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP (5.0 μM) em função das diferentes concentrações de POPG ($0 < [\text{POPG}] < 0.3 \text{ mM}$) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.0, $\lambda_{\text{exc}} = 515 \text{ nm}$. (B) Fluorescência total normalizada (A/A_0) em função da [POPG]. A e A_0 são as integrais dos espectros de emissão de fluorescência na presença e na ausência de lipídeo, respectivamente. A linha cheia corresponde ao ajuste dos pontos experimentais pela eq. (33).

Tabela 7: Valores da constante de associação, obtidos através dos dados de emissão de fluorescência da TMPyP em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH 7.0, pelo ajuste utilizando a equação (33), [TMPyP]=5 μ M.

Mistura lipídica	$K_b \times 10^3 \text{ (M}^{-1}\text{)}$
POPC+POPG (80:20)	2.9 ± 0.5
POPC+POPG (70:30)	3.7 ± 0.6
POPC+POPG (60:40)	13 ± 2
POPG (100)	27 ± 5

1.4.3.2. Supressão de fluorescência da TMPyP na presença de vesículas de fosfolípidios

A figura 47A apresenta os espectros de emissão da TMPyP na presença de 1 mM de POPC em tampão acetato-fosfato-borato pH 7.0 em função de diferentes concentrações de supressor (KI). Os dados de supressão de fluorescência no estado estacionário foram analisados segundo a equação de Stern-Volmer (eq. 28) e a equação quadrática (eq. 29). Na figura 47B mostramos os gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP na presença do POPC. O ajuste é linear na faixa de menores concentrações de supressor (0-12 mM, como observamos no inserto da figura) usadas neste estudo, e a constante de supressão K_{SV} apresentada na Tabela 8 corresponde ao ajuste linear.

Em altas concentrações de supressores foi possível realizar o ajuste com a equação quadrática (eq. 29) fornecendo os valores de K_D e K_S , mostrados na Tabela 8. O valor de K_D obtido pelo ajuste da equação quadrática (eq. 29) é muito menor quando comparada com o valor de K_{SV} obtido pelo ajuste linear. Além disso, o valor de K_S é significativamente menor em relação ao valor de K_D . Estes valores encontrados são similares ao obtidos para a TMPyP em solução tampão pH 7.0 a 25°C, indicando que a porfirina na presença do lipídeo POPC está totalmente acessível ao supressor. Outra justificativa para acreditarmos que a TMPyP não interage com o lipídeo zwitteriônico POPC é que o valor obtido do tempo de vida através da técnica de fluorescência no domínio da frequência, $\tau = 5.1\text{ns}$ é idêntico ao obtido para a porfirina em solução aquosa pura. A constante de supressão bimolecular k_q , que mede a acessibilidade da porfirina ao supressor, foi calculada pela relação $K_{SV} = \tau \times k_q$, onde τ é o tempo de vida da porfirina na ausência de supressor. Assim para o sistema TMPyP + POPC observamos que a

constante de supressão bimolecular está na faixa de $1.9\text{-}2.5 \times 10^{10}$, que foi calculada utilizando os valores de K_D e K_{SV} . (menor e maior valor, respectivamente). Este valor de k_q é um fator de 2 vezes maior do que o limite difusional, que é ao redor de $1.0\text{-}1.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [70], sugerindo uma pequena contribuição da supressão estática devido à formação de complexo porfirina-supressor.

Figura 47: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP na presença de 1 mM de POPC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 7.0, [TMPyP] = 5 μM e $0 < [\text{KI}] < 31$ mM. O comprimento de onda de excitação é 515 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP obtidos de medidas de fluorescência no estado estacionário na presença de 1 mM POPC. As linhas cheias em preto correspondem ao ajuste de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inserto mostrando o ajuste linear para baixas concentrações de supressor.

A figura 48A mostra os espectros de emissão da TMPyP na presença de 1 mM da mistura lipídica 70%POPC+30%POPG em função da concentração do supressor iônico KI. A figura 48B mostra o ajuste do gráfico de Stern-Volmer da TMPyP na presença de 70%POPC+30%POPG, o qual é linear para concentrações baixas de supressor (0-25 mM). O valor de K_{SV} obtido para a

porfirina na presença de 70%POPC+30%POPG foi de 40 M^{-1} , o valor de K_D foi de 38 M^{-1} , e o valor de K_S muito pequeno quando comparado ao K_D . Estes valores são 3.7 vezes menores aos encontrados para a porfirina pura em tampão. O valor encontrado para o tempo de vida da porfirina no domínio da frequência indica que algumas porfirinas podem estar ligadas à mistura lipídica 70%POPC+30%POPG, apresentando um valor de $\tau = 9.31 \text{ ns}$. Entretanto, observamos um decaimento de fluorescência bi-exponencial indicando que o tempo de vida curto está associado à porfirina livre em solução (5 ns, 30%) e o tempo longo à porfirina ligada à mistura lipídica 70%POPC+30%POPG (9.31 ns, 70%) (Tabela 8).

A figura 49A mostra os espectros de emissão da TMPyP na presença de 1 mM de POPG puro em função da concentração do supressor iônico KI. A figura 49B mostra o ajuste do gráfico de Stern-Volmer da TMPyP na presença de POPG, o qual é linear para concentrações baixas de supressor (0-25 mM). A TMPyP na presença de 1 mM de POPG puro apresentou o valor de $K_{SV} = 5 \text{ M}^{-1}$, $K_D = 4 \text{ M}^{-1}$ e $K_S = 0.02 \text{ M}^{-1}$ (Tabela 8). Este valor de K_{SV} é muito menor do que o valor encontrado em tampão e significa que a porfirina solubilizada nas vesículas de POPG não está tão acessível ao supressor aniônico como em tampão. Nossos resultados são similares aos obtidos para porfirinas hidrofóbicas em vesículas de fosfolípidos [89,90]. O valor de K_D encontrado é próximo ao obtido pelo K_{SV} , além do fato do K_S ser bem menor do que o valor de K_D , indicando possivelmente a ausência de supressão estática. Os valores de tempo de vida encontrados foram: 9.5 ns (81%) e 5 ns (19%), mostrando que mesmo na presença de POPG puro temos um decaimento de fluorescência bi-exponencial indicando que o tempo de vida longo corresponde à porfirina ligada ao lipídio e que o tempo de vida curto, corresponde à porfirina livre em solução. A partir dos valores de $\tau = 9.5 \text{ ns}$ encontramos os valores de k_q : $3.1\text{-}5.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o que está abaixo do limite difusional, indicando que no sistema TMPyP-POPG, temos possivelmente somente supressão colisional. Mesmo para $\tau = 5 \text{ ns}$, os valores encontrados para k_q (Tabela 8) estão abaixo do limite difusional. A supressão observada sugere que a TMPyP está na interface da vesícula e ao alcance do meio aquoso para ser suprimida pelo ânion iodeto. O aumento da concentração de POPG, leva a uma redução considerável de supressão de fluorescência, entretanto, as vesículas de POPG poderiam proteger a TMPyP, decrescendo o valor de K_{SV} . De fato as moléculas de TMPyP são menos acessíveis ao supressor iodeto, o que poderia ser justificado devido à interação que ocorre entre a porfirina catiônica e a vesícula aniônica. Esta

interação mantém o anel porfirínico na camada de Stern, reduzindo a acessibilidade do supressor iodeto, o qual é repelido também pela cabeça polar do lipídio aniônico.

Figura 48: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP na presença de 1 mM da mistura lipídica 70%POPC+30%POPG em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 7.0, $[TMPyP] = 5 \mu M$ e $0 < [KI] < 65$ mM. O comprimento de onda de excitação é 515 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP obtidos de medidas de fluorescência no estado estacionário na presença de 1 mM da mistura lipídica 70%POPC+30%POPG. As linhas cheias em preto correspondem ao ajuste de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inseto mostrando o ajuste linear para baixas concentrações de supressor.

Figura 49: (A) Espectros de emissão de fluorescência da TMPyP na presença de 1 mM de POPG em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, pH 7.0, [TMPyP] = 5 μ M e $0 < [KI] < 120$ mM. O comprimento de onda de excitação é 515 nm. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a TMPyP obtidos de medidas de fluorescência no estado estacionário na presença de 1 mM POPG. A linha cheia em preto corresponde ao ajuste de acordo com a equação quadrática (eq. 29). (C) Inseto mostrando o ajuste linear para baixas concentrações de supressor.

Tabela 8: Constantes de supressão e tempos de vida de fluorescência da TMPyP obtidas, respectivamente, dos experimentos de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo no domínio da frequência, na presença e na ausência de diferentes lipídios. O supressor utilizado foi o KI e [TMPyP] = 5 μM em T = 25°C.

Amostras	^a K _{SV} (M ⁻¹)	^b K _D (M ⁻¹)	^c K _S (M ⁻¹)	^d τ _f (ns)	^e k _q (M ⁻¹ s ⁻¹)
Tampão pH 7.0	151 ± 6	119 ± 5	0.021 ± 0.005	4.94 ± 0.02	2.4-3.1 x 10 ¹⁰
1mM POPC	128 ± 3	100 ± 4	0.010 ± 0.005	5.14 ± 0.03	1.9-2.5 x 10 ¹⁰
1 mM (70%POPC+30%POPG)	40 ± 1	38 ± 1	0.04 ± 0.002	*9.31±0.04(70%)	4.0-4.3 x 10 ⁹
				e	e
				5.0±0.1(30%)	7.5-7.9 x 10 ⁹
1mM POPG	5.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1	0.02 ± 0.004	*9.50±0.04(81%)	3.1-5.2 x 10 ⁸
				e	e
				5.0±0.1(19%)	0.6-1.0 x 10 ⁹

^a Constantes de Stern-Volmer obtidas do ajuste linear em baixas concentrações de supressor (ver texto).

^b Constantes de supressão dinâmica do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^c Constantes de supressão estática obtidas do ajuste utilizando a equação quadrática (eq. 29).

^d Tempos de vida de fluorescência obtidos do decaimento mono-exponencial, exceto onde marcado com *, que corresponde a um decaimento bi-exponencial.

^e Constantes de supressão bimolecular calculadas a partir da razão K_D/τ_f (valor menor) ou K_{SV}/τ_f (valor maior).

1.4.3.3. Discussão geral dos resultados de supressão de fluorescência da TMPyP na ausência e na presença de vesículas de fosfolípidos.

Em trabalhos anteriores de nosso grupo envolvendo a associação da TPPS₄ e a TMPyP com surfactantes iônicos, zwitteriônicos e neutros observamos que as porfirinas interagem com estes sistemas modelos através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Observamos também que o caráter hidrofóbico da TMPyP é muito menor do que o da TPPS₄. Além disso, observamos que as porfirinas na presença de surfactantes de carga oposta, em determinadas concentrações de surfactantes, formam agregados pré-micelares. Mesmo na presença de micelas mistas, observamos que estes agregados estão presentes.

Neste estudo da interação da TMPyP com diferentes lipídios e mistura lipídica concluímos que a porfirina catiônica realmente não interage com sistemas zwitteriônicos ou neutros, tais como o POPC, pois o seu carácter hidrofóbico é muito baixo. Por outro lado, esta porfirina catiônica interage fortemente com as misturas lipídicas de POPC+POPG, e com o aumento da concentração de POPG nesta mistura, aumenta a constante de associação entre a TMPyP e a mistura. A constante de associação observada é muito maior do que a encontrada para o sistema TMPyP-SDS. Isto pode ser justificado pela menor mobilidade encontrada para as vesículas de fosfolipídios em relação às micelas de surfactantes, ou seja, quando a porfirina interage com as vesículas de fosfolipídios, esta fica mais “presa” ao sistema biomimético, que apresenta duas cadeias hidrocarbônicas para cada monômero de fosfolipídeo deslocando o equilíbrio na direção da porfirina ligada [89,90].

A associação da TMPyP com as misturas lipídicas ou mesmo com o POPG puro não apresentou a formação de agregados de fosfolipídios-porfirina. Encontramos no equilíbrio porfirina livre em solução e porfirina ligada às vesículas de fosfolipídios.

Simultaneamente, os valores de constante de supressão bimolecular k_q utilizando como supressor o íon iodeto, também são bastante dependentes da concentração de lipídio aniônico na mistura. A presença de POPG diminui o valor encontrado para k_q em relação à porfirina em tampão. Os valores de k_q encontrados para a TMPyP na presença de POPG estão abaixo do limite difusional. É importante mencionar que o menor valor de K_{SV} encontrado para a TMPyP na presença de POPG também pode estar relacionado com a repulsão eletrostática da carga negativa da cabeça polar do lipídio aniônico e o supressor aniônico.

Neste estudo, os gráficos de Stern-Volmer são lineares em concentrações baixas de supressores. Entretanto, para se ajustar o gráfico de Stern-Volmer para toda a faixa de concentração de supressor, foi necessário o uso da equação quadrática, onde as supressões dinâmica e estática foram incluídas. Em todos os casos, a supressão estática é significativamente menor quando comparada à supressão dinâmica. Os nossos dados de tempo de vida de fluorescência obtidos em um fluorímetro no domínio da frequência são consistentes com dados relatados na literatura [7,87,88]. Entretanto, futuramente pretendemos realizar um estudo sistemático utilizando um fluorímetro no domínio da frequência para se determinar as constantes de associação para as diferentes misturas lipídicas e determinar as constantes de supressão, para confirmarmos que realmente a supressão estática é desprezível (ou seja, não há formação de

complexo). Além disso, pretendemos realizar um estudo similar com a porfirina aniônica na presença de DOTAP puro e em misturas com POPC.

PARTE II

II.1. Introdução

II.1.1 Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp)

Na primeira parte desta tese de doutorado foram realizados estudos da interação de porfirinas com sistemas biomiméticos de membrana biológica. Os modelos biomiméticos utilizados foram micelas iônicas, zwitteriônicas e neutras, micelas mistas e vesículas de fosfolipídios. Foram utilizadas diferentes técnicas espectroscópicas, tais como absorção ótica, fluorescência e espalhamento de luz. Nesta segunda parte da tese realizamos o estudo de uma hemoproteína gigante na presença de diferentes surfactantes utilizando diferentes técnicas espectroscópicas, sendo que algumas delas são comuns aos estudos envolvendo as porfirinas. Além disso, utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico realizamos alguns experimentos com o objetivo de estudar a estabilidade térmica e o efeito da dissociação e desnaturação em função do pH da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*. Estes estudos constituem a segunda parte desta tese.

As hemoproteínas constituem um dos sistemas mais relevantes dentro da química de proteínas e enzimas. O grupo heme é um grupo prostético que se encontra no interior da estrutura 3D de cada cadeia polipeptídica da hemoglobina. Sua estrutura consiste de quatro anéis pirrólicos coplanares, ligados entre si através de uma ponte de metina. A cada um dos anéis pirrólicos está ligado um grupo propionato ou um grupo eteno. Os átomos de nitrogênios dos anéis pirrólicos estão orientados para o centro da estrutura, coordenados a um íon de ferro central. A quinta coordenação do ferro ocorre com uma das histidinas, a F8 ou histidina proximal. Esta interação faz com que o átomo de ferro fique fora do plano da porfirina, quebrando a simetria planar. A ligação com a molécula de O₂ ocorre do outro lado do plano do heme, e assim, através da ligação Fe-O₂ é possível o transporte de O₂ necessário à respiração celular. No caso fisiológico, a histidina E7, denominada distal, está voltada para a sexta coordenação do Fe dando estabilidade à ligação Fe-O₂ que ocorre nesta posição.

A ligação do O₂ à hemoglobina é cooperativa, isto é, a ligação de uma molécula de O₂ a um grupo heme, facilita a ligação de outra molécula de O₂ com outro heme do mesmo tetramero,

e assim sucessivamente. A saída da molécula de O₂ de um heme facilita a saída das outras moléculas de O₂ ligadas aos outros grupos heme.

Dessa forma, as propriedades intrínsecas das hemoproteínas, assim como a sua relação estrutura-atividade, envolvem fenômenos tais como cooperatividade e afinidade por ligantes específicos que estão associados a uma variedade de processos que viabilizam a vida [99].

Hemoglobinas, mioglobinas e citocromos são exemplos de hemoproteínas com elevada especificidade de funções no meio biológico de uma variedade de seres vivos. Apesar de amplamente estudados, os sistemas hemoproteicos ainda permanecem intrigantes sob vários aspectos físico-químicos. Dentro deste contexto, a popularização de diferentes técnicas biofísicas contribuiu significativamente para a evolução no entendimento da relação estrutura-atividade destes sistemas [100,101].

A hemoglobina extracelular gigante, segundo Vinogradov [102], constitui o ápice de complexidade em hemoproteínas que carregam oxigênio. A hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) pertence à classe das hemoglobinas extracelulares gigantes. A HbGp é especialmente semelhante a hemoglobina de *Lumbricus terrestris* (HbLt) que vem sendo extensamente estudada por vários grupos de pesquisa [100-102]. Assim, a hemoglobina estudada neste trabalho é extraída do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (HbGp) apresentando uma massa molecular mínima de 3.1 MDa [103], determinada há cerca de 20 anos por ultracentrifugação em gradiente. Supondo uma alta similaridade estrutural entre HbGp e HbLt podemos propor que a macroproteína em estudo apresenta uma disposição altamente organizada envolvendo 144 cadeias polipeptídicas com grupo heme e mais 36 cadeias polipeptídicas sem grupos heme, que são chamadas cadeias *Linker* (Figura 50, ref.[104]). A estrutura oligomérica é composta de dois discos hexagonais que formam uma espécie de bicamada hexagonal sendo que a dissociação dessa estrutura origina a formação de doze unidades de peso molecular 1/12 da molécula íntegra [104,105]. A proteína gigante é composta de quatro subunidades, com enovelamento típico para globinas, 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. Além destas quatro subunidades que contem o grupo heme, a proteína possui várias cadeias polipeptídicas que não tem esse grupo (linkers). O papel destas subunidades (linkers) está provavelmente relacionado com a manutenção da estrutura global oligomérica. No caso da hemoglobina extracelular de *Lumbricus terrestris*, extraída de minhoca

comum no hemisfério norte, especialmente na região de Vancouver, Canadá, as subunidades são bem conhecidas em termos de sequência primária e a estrutura da macroproteína tem sido estudada na forma cristalográfica pelo grupo de W. E. Royer Jr. Recentemente foi descrito o sequenciamento da quarta cadeia linker L_4 para esta proteína [105]. A estrutura cristalográfica da HbLt foi reportada na literatura inicialmente com baixa resolução de 5.5 Å [106], e mais recentemente esta estrutura foi refinada até 3.5 Å [104]. Estes trabalhos mostram em bastante detalhe a disposição na bicamada hexagonal das várias cadeias polipeptídicas que compõem a proteína, incluindo as cadeias tipo globinas e os linkers.

Figura 50: Estrutura quaternária da hemoglobina íntegra de *Lumbricus terrestris*, que pertence à mesma classe Oligochaeta que abrange a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, contendo 144 cadeias heme e 36 cadeias Linkers em um arranjo espacial conhecido como modelo do bracelete [104].

A forte analogia da HbGp com a HbLt está baseada em estudos antigos de microscopia eletrônica onde a presença de estruturas hexagonais, em pH 7.3 correspondentes à proteína nativa, e a sua desapareição em pH 8.6, foi evidenciada [107]. Recentemente através de estudos envolvendo a técnica de MALDI-TOF-MS conseguimos obter informação detalhada sobre algumas subunidades, o que confirmou a similaridade entre as duas proteínas [108]. Observamos que o monômero *d* possui massa molecular (MM) em torno de 16 kDa, o trímero *abc* apresenta

MM de 52 kDa e as cadeias linkers são observadas com massa molecular de 26-32 kDa [108]. Assim, duas isoformas majoritárias do monômero d (d_1 e d_2) de proporções idênticas com massas de $16,355 \pm 25$ e $16,428 \pm 24$ Da, respectivamente, e duas isoformas menores (d_3 e d_4) com massas em torno de 16.6 kDa foram caracterizadas. Baseando-se nas MM destas subunidades determinadas por espectrometria de massas e considerando que a estequiometria do oligômero da HbGp é $12(abcd)_3L_3$ [109,110], podemos prever que a MM da HbGp está em torno de 3.4 MDa, um valor maior do que o observado anteriormente por Costa e colaboradores [103] e que permanece como a única referência disponível de massa total da HbGp. Entretanto, apesar de termos definido os valores de massa de algumas subunidades por espectrometria de massa, não podemos propor o valor exato da massa da proteína, pois ainda não sabemos exatamente qual é a estequiometria do oligômero. Por estas razões, a determinação da massa total da HbGp permanece uma questão relevante a ser investigada.

Esta classe de hemoglobina é altamente cooperativa e auto-organizável, como demonstram estudos de reassociação [100,109], apresentando grande estabilidade redox, sendo inclusive protótipo para a constituição de substitutos sanguíneos, ou seja, de sangue artificial [111]. A grande estabilidade redox representa um importante fator no que se refere à estocagem da hemoglobina por períodos prolongados.

A estrutura oligomérica e propriedades espectroscópicas da HbGp vem sendo estudadas há alguns anos em nosso laboratório de Biofísica Molecular. Nosso grupo tem proporcionado nos últimos anos uma contribuição significativa no estudo de hemoglobina extracelular, mais especificamente, da HbGp [112-119]. A interação da HbGp com surfactantes iônicos apresenta uma abordagem interessante, e de grande relevância interdisciplinar, uma vez que os surfactantes são largamente empregados em bioquímica e biotecnologia para a solubilização protéica, purificação, caracterização e determinação de estrutura de proteínas. Assim, a interação com surfactantes, em várias faixas de concentração, pode proporcionar informações significativas a respeito do arranjo estrutural.

Recentemente, Gelamo e colaboradores [116] mostraram através do uso da técnica de SAXS o equilíbrio de dissociação da macroproteína em pH 9.0 e na presença de SDS. Resultados interessantes relativos à estabilidade da proteína nas formas reduzida (oxi) e oxidada (meta) em pH 7.0 também foram evidenciados [113,114,116,119], bem como o efeito do SDS na dissociação da hemoglobina gigante, caracterizando as partículas espalhadoras em solução.

Muitos estudos sobre a estabilidade e composição da estrutura oligomérica de diferentes proteínas gigantes como a HbGp [108,112,120], HbLt [102,109] e hemoglobina de *Arenicola Marina* [121] estão sendo realizados por diferentes grupos de pesquisas, através de mudanças na composição do meio, assim como, variação do pH, presença de sais e agentes desnaturantes.

1.1.1. Desnaturação de proteínas

As proteínas são caracterizadas por uma estrutura tridimensional bem definida que corresponde a uma conformação nativa, em consequência de um equilíbrio de forças entre as diversas subunidades da proteína e o solvente [122,123]. A desnaturação de proteína envolve a perturbação das forças que estabilizam a conformação nativa, quebrando e reorganizando ligações não covalentes e pontes salinas, e levando à modificação nas estruturas secundária, terciária, e quaternária da proteína [109,124], com uma perda irreversível de atividade produzindo o seu desenovelamento (“unfolding”). Entre os efeitos mais comuns que induzem a desnaturação de proteína temos: aumento da temperatura acima de um certo limite, variação da constante dielétrica do meio em presença de solventes orgânicos, mudanças drásticas do pH e agentes químicos específicos que levam a ruptura da conformação nativa (como por exemplo, a uréia e o cloreto de guanidina (GdmHCl)) [125].

Intensidades espectroscópicas de emissão de fluorescência e de absorção ótica fornecem informações locais de proteínas, onde mudanças estruturais ao redor do grupo do cromóforo ou fluoróforo são observadas. Métodos espectroscópicos foram usados no passado, e permanecem indispensáveis para a pesquisa de soluções de proteína devido a sua versatilidade, sensibilidade, resolução temporal, e aplicabilidade bastante ampla.

Alguns trabalhos na literatura têm reportado o efeito da desnaturação na estrutura secundária e terciária das proteínas, assim como mudanças no tamanho e forma das hemoproteínas [125,126]. É interessante destacar que a desnaturação de proteínas acontece, em geral, numa concentração muito menor de surfactante quando comparada à concentração necessária de outros agentes químicos desnaturantes, comumente utilizados, tais como uréia (6-8 M) e guanidina (4-6M).

II.2 Objetivos

Neste trabalho o nosso objetivo foi estudar a estabilidade da proteína nativa frente aos processos de dissociação oligomérica, de oxidação do heme, de desnaturação da HbGp em diferentes condições experimentais. Mudanças nos valores de pH e temperatura, bem como a presença de surfactantes, foram utilizados como agentes externos indutores das alterações da proteína, o que permitiu contribuir para uma compreensão mais aprofundada em nível molecular das interações entre as subunidades responsáveis pela manutenção da estrutura oligomérica da proteína gigante, bem como de seu comportamento em relação à presença de surfactantes iônicos de cargas diferenciadas.

II.2.1 Objetivos específicos

- 1) Determinar as propriedades da hemoglobina na presença das micelas aniônica, catiônica e zwitteriônicas observando como a presença dos surfactantes altera a estrutura da HbGp.
- 2) Através das titulações espectrofotométricas da HbGp em função da concentração dos diferentes sistemas modelo (micelas de SDS, CTAC e HPS) nos pHs 7.0 e 9.0, fazer um estudo comparativo da interação da HbGp com os diferentes surfactantes.
- 3) Estudar a dissociação e desnaturação da HbGp na sua forma oxi, em função do pH e da temperatura (melting point) por espalhamento de luz dinâmico (DLS do inglês “Dynamic Light Scattering”).

II.3 Materiais e Métodos

II.3.1 Materiais

A hemoglobina extracelular em estudo é extraída do anelídeo *Glossoscolex paulistus* pertencente ao filo Anelidae, à classe Oligochaeta e à família Glossoscolecidae. Este anelídeo é natural dos solos calcários da região que se estende de Araras até Piracicaba, estado de São Paulo. As características físicas de cada espécime limitam-se a um comprimento que varia de 280 a 305 mm, diâmetro de 10 a 11 mm e massa aproximada de 15 g.

A hemolinfa extraída foi purificada de acordo com procedimentos já descritos na literatura [113,114]. A fase final de purificação da proteína, consiste da aplicação de 1.0 mL da hemoglobina previamente purificada numa coluna de filtração de gel Sephadex G-200 de 100 cm de comprimento por 1.0 cm de diâmetro equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0. As frações de hemoglobina pura são analisadas espectrofotometricamente nos comprimentos de onda 415 e 280 nm e armazenadas a 4°C.

As concentrações das amostras foram obtidas espectrofotometricamente, utilizando os seguintes coeficientes de absorvidade molar da proteína na sua forma oxi-, obtidos na literatura [114]: $\epsilon_{280\text{nm}}=2.5 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{415\text{nm}}=5.4 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

II.3.1.1 Preparação das amostras de HbGp em função da concentração de diferentes surfactantes para as medidas espectroscópicas.

As amostras de HbGp foram preparadas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0 e 9.0, a concentração de proteína foi de 0.08 mg/ml para as medidas de absorção ótica, fluorescência, e dicroísmo circular. Para as titulações foram preparadas diferentes amostras de proteína e em cada amostra foi adicionado uma alíquota de soluções de surfactantes concentrada, em geral a faixa de concentração de surfactante utilizada foi de 0-10 mM. Cada amostra tinha um volume final de 1 ml, e a mistura foi equilibrada por duas horas antes de se realizar as medidas, em temperatura ambiente ($T=25^{\circ}\text{C}$). Este tempo foi definido através dos espectros de absorção ótica, onde observamos que após 2, 6 e 24hs do preparo das amostras não ocorreram mudanças espectrais significativas.

II.3.1.2 Preparação das amostras de HbGp em diferentes valores de pH para as medidas de DLS.

Foram preparadas diferentes amostras de HbGp no tampão acetato-fosfato-borato 30 mM em diferentes valores de pH. Os valores de pH foram ajustados com soluções estoques de NaOH e HCl diluído. O volume de amostra preparada para cada medida de espalhamento de luz foi de 2.0 mL. A partir de um estoque de hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) concentrada foram feitas as diluições necessárias para obter uma concentração final de HbGp de 0.5 mg/ml no tampão apropriado. As amostras foram filtradas com um filtro de poro 0.45 µm (Whatman, USA) diretamente em uma cubeta de plástico própria para as medidas de espalhamento de luz, para evitar ao máximo a presença de partículas contaminantes (“dust”), que podem levar a um resultado de espalhamento de luz parcial e incorreto, afetando a determinação das dimensões das partículas espalhadoras.

II.3.2 Métodos

II.3.2.1 Fluorescência

Triptofano, tirosina e fenilalanina são três aminoácidos presentes em proteínas que são capazes de emitir fluorescência. A técnica de fluorescência intrínseca do triptofano é uma das mais utilizadas em biofísica molecular, principalmente em estudos relacionados com mudanças conformacionais locais de proteínas. O triptofano é sensível ao ambiente ao qual ele está exposto, apresentando diferentes características fluorescentes que são dependentes do grau de exposição ao solvente hidrofílico ou regiões hidrofóbicas da proteína. Proteínas na presença de ligantes podem sofrer mudanças na região do triptofano que podem ser monitoradas pela técnica de fluorescência [70].

Segundo o modelo do monômero *d* da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, proposto por Cabral e colaboradores [127], pelo menos um dos três triptofanos, que são os resíduos responsáveis pela fluorescência das cadeias globínicas, está praticamente mergulhado no bolsão do heme, e as condições do meio que geram a solvatação dos triptofanos das cadeias polipeptídicas devem representar condições próximas daquelas que correspondem a uma

acessibilidade mais efetiva do solvente aquoso em relação ao bolsão, a priori, hidrofóbico do heme. Assim, com as medidas de fluorescência podemos acompanhar os processos de dissociação da HbGp em função do pH e na presença de surfactantes. As medidas de Fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro Hitachi F4500.

II.3.2.2 Dicroísmo Circular (CD)

A espectropolarimetria de CD é amplamente utilizada para estimar a quantidade de estrutura secundária de uma determinada proteína e avaliar mudanças conformacionais ocasionadas por ligantes, agentes desnaturantes (surfactantes, pH, uréia, cloridrato de guanidina, etc) e temperatura [128]. A avaliação da estabilidade de uma dada proteína frente à desnaturação utilizando a técnica de CD pode fornecer informações sobre processos dinâmicos, como interações com ligantes e presença de domínios na proteína com diferentes estabilidades [128]. Assim, a técnica de dicroísmo circular (CD) permitiu avaliar as mudanças de estrutura secundária na presença de surfactantes. As medidas de CD foram complementares as de fluorescência e absorção ótica.

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO 720 no laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos/USP, com uma cubeta cilíndrica de caminho ótica 1 mm. Os espectros foram obtidos na faixa de 240 a 195 nm com resolução de 1nm, e a velocidade de varredura foi de 100 nm/min.

II.3.2.3 Espalhamento de luz dinâmico

A interação da radiação eletromagnética com a matéria pode produzir vários efeitos: absorção, emissão, transmissão ou espalhamento. O espalhamento de luz ocorre quando o campo elétrico oscilante da radiação incidente num átomo induz oscilações periódicas na sua nuvem eletrônica, passando o mesmo a funcionar como fonte secundária de radiação. Ao atravessar uma amostra uma dada radiação, e interagindo com as moléculas da amostra, o instrumento registra o espalhamento causado pelas moléculas. É em função do raio de espalhamento e da intensidade da radiação espalhada, que podemos obter dados sobre a dimensão das partículas [129].

A intensidade de espalhamento de luz é observada num intervalo de tempo curto de segundo ou micro-segundo, sendo esta a diferença básica entre o processo de espalhamento de luz estático (SLS do inglês “Static Light Scattering”) e o espalhamento de luz dinâmico (DLS do inglês “Dynamic Light Scattering”). O espalhamento de luz estático baseia-se na medida da intensidade da luz espalhada das partículas durante um certo intervalo de tempo, enquanto que o espalhamento de luz dinâmico mede as flutuações instantâneas dessa mesma intensidade as quais, estão relacionadas com as propriedades dinâmicas das partículas.

As flutuações da intensidade de espalhamento de luz detectadas no DLS estão relacionadas com o movimento Browniano da partícula devido a flutuações de densidade. Estas são causadas por aglomeração accidental de partículas e variação do número de moléculas no volume disperso. O coeficiente de difusão do soluto pode ser medido por uma função de autocorrelação [130].

O espalhamento de luz dinâmico mede a dependência da luz espalhada em um ângulo fixo em função do tempo. Sendo assim, a medida de espalhamento de luz é muito útil na determinação de características estruturais de partículas, envolvendo uma relação inversa entre o tamanho da partícula e o ângulo de espalhamento.

Sabe-se que a difusão regida pelo movimento Browniano é inversamente proporcional ao tamanho da partícula. A dependência da intensidade de flutuação em relação ao tempo é uma função do tamanho da partícula. Partículas pequenas movem-se rapidamente e a luz espalhada mostra flutuações rápidas. Ao contrário, partículas grandes difundem-se vagarosamente de modo que o feixe de luz espalhada apresenta flutuações lentas. Portanto, variações no nível de luz carregam informações úteis sobre o tamanho de partícula. Entretanto, para que informações úteis sobre o tamanho de partículas sejam obtidas, é necessário examinar as propriedades estatísticas das flutuações da luz, o que é feito através da função de autocorrelação. Esta função descreve o quão rápido o sinal varia e quanto tempo o mesmo leva para perder a memória do valor anterior, em decorrência do movimento Browniano das partículas. A função de correlação é em geral uma função exponencial e está diretamente relacionada com o tamanho de partícula da amostra. O coeficiente de difusão pode ser obtido por meio da função de autocorrelação. O tamanho da partícula pode ser especificado pelo raio ou diâmetro. A medida da quantidade total de partículas de tamanho equivalente é uma função aditiva tal como volume, massa ou área superficial [131].

Em DLS a intensidade de flutuações de espalhamento de luz é analisada. A velocidade de flutuação é relatada pelo coeficiente de difusão das espécies espalhadoras. O raio de uma esfera equivalente à partícula espalhadora com o mesmo coeficiente de difusão é definido como o raio hidrodinâmico. O parâmetro Z-Average obtido por DLS é o diâmetro médio das partículas espalhadoras, sendo obtido do coeficiente angular da forma linear da função correlação (método de Cumulante). Raios adicionais tais como o raio de rotação, raio de massa e o raio de giro também são definidos. As moléculas em soluções sofrem difusão constante. Esta difusão é o resultado de flutuações térmicas na suspensão e é associada ao "movimento Browniano". O coeficiente de difusão é relacionado ao tamanho do objeto de difusão [131]. Sendo assim, se o coeficiente de difusão é medido e a viscosidade do solvente é conhecida, o raio hidrodinâmico pode ser calculado através da equação de Stokes-Einstein (eq. 33):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (33)$$

Onde k é a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do meio e R_H o raio hidrodinâmico das partículas espalhadoras, supondo que estas são esféricas.

Experimentos de DLS foram realizados em Portugal, na Universidade de Lisboa, durante estágio de doutorado no exterior da doutoranda Patrícia S. Santiago. Este estágio foi realizado de 01 de junho a 30 de novembro de 2006, sob a co-orientação do professor português Prof. Dr. Nuno C. Santos e também sob a orientação do Prof. Dr. Marcel Tabak. O equipamento utilizado em Lisboa/Portugal foi o non-invasive back scatter (NIBS), com ângulo de espalhamento fixo em 173° , da Malvern, Modelo Nano Zeta Size. Este equipamento dispõe de um laser com o comprimento de onda em 633 nm.

II.4 Resultados e discussões

II.4.1 Interação da HbGp com os surfactantes SDS, CTAC e HPS : dissociação da estrutura oligomérica e auto-oxidação do heme

II.4.1.1 Estudos da interação da HbGp com os diferentes surfactantes por absorção ótica.

A figura 51 mostra os espectros de absorção da HbGp (0.08 mg/ml) no pH 7.0 em função da concentração de CTAC. Os espectros de absorção foram divididos em dois grupos, um correspondendo a baixas (na faixa de 0-0.06 mM, Figura 51A) e altas concentrações de surfactante (0.08-10 mM, Figura 51C). Nos insertos da figura 51 a região das bandas Q (500 -600 nm) e a banda de transferência de carga ligante-metal (LMCT) (usualmente acima de 600 nm) estão apresentadas de forma mais clara. Na faixa de concentração baixa de surfactante, observamos um decréscimo da intensidade de absorção e um deslocamento para azul no máximo da banda de Soret (415 nm) (Figura 52 A,B). Para concentrações baixas de surfactantes (0.03-0.15 mM) observamos um aumento da absorção em 490 e 700 nm (Figura 51). Nesta faixa de concentração foi observado um aumento na intensidade de espalhamento de luz para o sistema HbGp-CTAC. Os espectros de absorção para concentrações de CTAC na faixa de 0.03-0.15 mM foram corrigidos, pela subtração da função espalhadora, $I_{\text{esp}} = A/\lambda^4$, que é caracterizada pelo espalhamento de Rayleigh. O fator A foi estimado para cada espectro experimental no comprimento de onda onde a absorção é praticamente nula (normalmente ao redor de 630 nm). Esta espécie que aparece nesta faixa de concentração baixa de CTAC, e que apresenta um alto espalhamento de luz está associada à formação de um complexo proteína-surfactante. As figuras 51, 52A e 52B apresentam os espectros de absorção com o espalhamento corrigido. O aumento da concentração de surfactante resolubiliza estes agregados de proteína-surfactante, dando origem a uma espécie de menor intensidade de absorção, com um deslocamento para azul, e o surgimento de um ombro em 360 nm, além do aparecimento da banda por volta de 600 nm, característica de espécie pentacoordenada. As mudanças espectrais observadas para baixas concentrações de CTAC sugerem uma contribuição significativa de interação eletrostática proteína-surfactante.

Figura 51: Espectros de absorção ótica da HbGp 0.08mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de CTAC na faixa de 0-10 mM. (A) Espectros de absorção na faixa de concentração de CTAC de 0-0.06 mM; (B) Inseto da região das bandas Q; (C) Espectros de absorção na faixa de concentração de CTAC de 0.08-10.0 mM; (D) Inseto da região das bandas Q e LMCT.

Figura 52: (A) Mudanças no comprimento de onda máximo da banda de Soret, (B) Absorbâncias em 415 nm e 602 nm (C) Absorbâncias em 490 nm e 700 nm em função da concentração de CTAC. Os dados apresentados para 700 nm em (C) foram multiplicados por um fator 2.15 para normalizar com o valor máximo correspondente aos dados em 490 nm. Essas mudanças correspondem aos espectros de absorção apresentados na figura 51, exceto em 490 e 700 nm onde utilizamos os máximos encontrados nos espectros originais sem correção (ver no texto).

O conjunto de espectros apresentados na Figura 51 foi analisado pelo método de CCA [117,118], sendo decomposto em três componentes. Dessa forma, três espécies diferentes foram obtidas dependendo da concentração de CTAC presente no equilíbrio, cujos espectros são

apresentados na figura 53. A espécie 1 corresponde à proteína pura, a segunda espécie é associada ao precipitado proteína-surfactante. A espécie 2 é associada, provavelmente, ao alto espalhamento de luz observado nos espectros de absorção ótica apresentados na figura 52C. A terceira espécie é associada a algum complexo proteína-surfactante (espécie 3), que é decorrente da resolubilização na presença de altas concentrações de CTAC no precipitado proteína-surfactante (espécie 2). Provavelmente, esta espécie consiste de uma mistura de várias subunidades produzidas pela dissociação da HbGp íntegra. Na figura 53C observamos que para termos 50% da formação deste precipitado proteína-surfactante a faixa de concentração crítica é de 0.03-0.15 mM de CTAC, o que está de acordo com os dados apresentados na fig. 52. Acima de 1 mM de CTAC não observamos mudanças significativas nos espectros de absorção. A espécie 3 é caracterizada pelo surgimento de uma banda característica em 602 nm, o que implica uma mudança na esfera de coordenação do ferro, sugerindo a formação de uma espécie pentacoordenada.

A figura 54 apresenta os espectros de absorção da HbGp 0.08 mg/ml em função da concentração de SDS. Os espectros foram divididos em duas partes, abaixo de 2 mM de SDS (Figura 54A) e acima de 2 mM de SDS (Figura 54C). Nos insertos (Figuras 54B e 54D) estão apresentadas com mais clareza as bandas Q e a banda LMCT. A adição de SDS diminuiu a intensidade de absorção e provocou um deslocamento para o azul (Figura 55), similar ao observado para o CTAC. Entretanto, a intensidade máxima dos espectros de absorção (Figura 55A) e a intensidade da absorção na banda de Soret (Figura 55B) diminuiu consideravelmente para a concentração de SDS igual a 5 mM, enquanto que a mudança na presença do CTAC é essencialmente completada em 0.6 mM (Figuras 52A e 52B). Assim, observamos que para ocorrer a mudança espectral característica da oxidação do heme na presença de SDS, necessitamos de uma maior concentração de surfactante do que quando comparada com o sistema HbGp-CTAC, o que poderia justificar a menor contribuição eletrostática para a interação proteína-surfactante. Não foi observado espalhamento nos espectros de absorção para nenhuma faixa de concentração de SDS, o que é consistente com a absorção praticamente nula em 490 nm na presença de SDS. A análise dos dados de absorção ótica da HbGp em função da concentração de SDS pelo método CCA, resultou em um equilíbrio de duas espécies diferentes em função da concentração de SDS (dados não mostrados).

Figura 53: Análise dos espectros de absorção mostrados na figura 51 pelo método CCA (Convex Constraint Algorithm) [91]. (A) Espectros de absorção ótica das espécies puras obtidas pelo CCA. (B) Frações das espécies puras presentes no equilíbrio em função da [CTAC].

A figura 56 apresenta os espectros de absorção ótica da HbGp em função da concentração de HPS para baixas (0-0.4 mM, Fig. 56A) e altas (0.5-10 mM, Fig. 56B) concentrações de HPS. Observamos que o aumento da concentração de surfactante produz a diminuição da intensidade da banda de Soret e o surgimento de uma banda em torno de 600 nm (LMCT). A análise dos dados pelo método CCA apresenta um equilíbrio de duas espécies distintas (Figura 57). A primeira espécie corresponde a proteína pura, e a segunda espécie corresponde ao complexo

HbGp-HPS. O valor de concentração de HPS marcado na figura 57B (0.45 mM), caracteriza o ponto onde temos 50% da espécie 1 e 50 % da espécie 2. É importante mencionar que para o SDS este ponto é observado para a concentração de 2 mM. A HbGp na presença de HPS e SDS não forma um precipitado proteína-surfactante, o qual é responsável pelo aumento de espalhamento de luz nos espectros de absorção. O ponto de transição entre a espécie 1 e a espécie 2, para os sistemas HbGp-SDS e HbGp-HPS, pode corresponder à transição entre a hemoglobina na sua forma oxi e a espécie pentacoordenada. Entretanto, a forma oxi-hemoglobina e a sua forma hemicromo férrica são bastante similares e difíceis de serem distinguidas por técnicas espectroscópicas.

Figura 54: Espectros de absorção ótica da HbGp 0.08mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de SDS na faixa de 0-10 mM. (A) Espectros de absorção na faixa de concentração de SDS de 0-2.0 mM; (B) Inserto da região das bandas Q; (C) Espectros de absorção na faixa de concentração de SDS de 2.0-10.0 mM; (D) Inserto da região das bandas Q e LMCT.

Figura 55: (A) Mudanças no comprimento de onda máximo da banda de Soret, (B) Absorbâncias em 415 nm e 608 nm (C) Absorbâncias em 490 nm em função da concentração de SDS. Essas mudanças correspondem aos espectros de absorção apresentados na figura 54.

Figura 56: Espectros de absorção ótica da HbGp 0.08mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de HPS na faixa de 0-10 mM. (A) Espectros de absorção na faixa de concentração de HPS de 0-0.4 mM; (B) Inserto da região das bandas Q; (C) Espectros de absorção na faixa de concentração de HPS de 0.5-10.0 mM; (D) Inserto da região das bandas Q e LMCT.

Figura 57: Análise dos espectros de absorção mostrados na figura 56 pelo método CCA (Convex Constraint Algorithm) [91]. (A) Espectros de absorção ótica das espécies puras obtidas pelo CCA. (B) Fração das espécies puras presentes no equilíbrio.

Os espectros de absorção ótica da HbGp em função da concentração de CTAC, SDS e HPS obtidos no pH 9.0 apresentam mudanças espectrais bastante similares às observadas em pH 7.0. O espectro de absorção da HbGp no meio alcalino é caracterizado por uma banda de Soret de menor intensidade do que em pH 7.0. Além disso, é observado o surgimento da banda característica LMCT próxima de 600-605 nm, caracterizando a presença de espécie pentacoordenada. Os espectros de absorção ótica da HbGp na presença de 10 mM de CTAC são praticamente idênticos em ambos os pHs. Observamos uma pequena diferença para a HbGp na

presença de 10 mM de SDS nos pHs 7.0 e 9.0. A banda de Soret é deslocada para o vermelho no pH 9.0 quando comparada com o pH 7.0 (Tabela 9).

Tabela 9: Efeito dos surfactantes no comprimento de onda máximo de absorção, ($\lambda_{\max}$), da HbGp em tampão Tris-HCl 20 mM, obtidos dos espectros de absorção ótica.

Surfactantes/pH	Banda de Soret	Bandas Q	Banda LMCT
Tampão/ 7.0	346 ^s , 415	540, 575	-
10 mM CTAC/ 7.0	359 ^s , 402	572 ^b	602 ^b
10 mM SDS/ 7.0	360 ^s , 402	491, 527	606
10 mM HPS/7.0	360 ^s , 406	533 ^b , 572	603 ^b
Tampão/ 9.0	349 ^s , 414	540, 574	-
10 mM CTAC/ 9.0	360 ^s , 401	572 ^b	600 ^b
10 mM SDS/ 9.0	360 ^s , 405	487 ^b , 529, 565 ^b	606
10 mM HPS/9.0	360 ^s , 407	530 ^b , 567	606

A faixa de concentração da HbGp é de 0.08 – 0.09 mg/ml.

^s Significa que a banda é observada como um ombro.

^b Significa que a banda é alargada.

II.4.1.2 Intensidade de espalhamento de luz

A figura 58 apresenta os dados de intensidade de espalhamento de luz (LSI do inglês “light scattering intensity”) da HbGp 0.08 mg/ml no pH 7.0. O espalhamento foi medido para as mesmas amostras descritas nas medidas de absorção ótica. As medidas de espalhamento de luz foram realizadas no fluorímetro medindo a intensidade de luz a 90° com os comprimentos de onda de excitação e emissão mantidos igualmente fixos em 350 nm. A intensidade de espalhamento da HbGp no pH 7.0 apresenta um valor relativamente alto (ao redor de 1000 u.a) devido ao fato da proteína apresentar sua estrutura oligomérica com uma dimensão máxima de 30 nm [116,120]. A adição de SDS diminui a intensidade de espalhamento de luz, correspondendo à dissociação da estrutura oligomérica em pequenas subunidades da proteína (a intensidade de espalhamento diminui para cerca de 200 u.a para a concentração de SDS igual a 1 mM, Fig. 58A). Na presença de CTAC, observamos inicialmente um aumento da intensidade de

espalhamento, atingindo um valor máximo de intensidade de espalhamento (9000 u.a) na faixa de concentração de 0.04-0.08 mM de CTAC. Para maiores concentrações de CTAC a intensidade de espalhamento diminui drasticamente (Fig. 58B).

Figura 58: Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbGp 0.08mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM no pH 7.0, na presença de concentrações crescentes de SDS (A) e CTAC (B). O inserto (C) corresponde à faixa de concentração de CTAC entre 0-0.95 mM. A intensidade de espalhamento foi medida a 90° no fluorímetro com os comprimentos de onda de excitação e emissão iguais e fixos em 350 nm.

II.4.1.2 Estudos da interação da HbGp com os diferentes surfactantes por dicroísmo circular (CD)

Os dados de dicroísmo circular da HbGp-CTAC são apresentados na figura 59. Observamos a coexistência de três espécies em função da concentração de CTAC, o que está de acordo com os dados de absorção ótica. A espécie 1 corresponde a proteína pura na ausência de

surfactante, enquanto que a espécie 2 está associada ao precipitado HbGp-CTAC. Esta espécie apresenta a menor elipticidade de todas as espécies observadas e, provavelmente, corresponde a desnaturação parcial da proteína. É importante mencionar que o espectro de CD para a espécie 2 pode estar distorcido, devido ao espalhamento observado em absorção ótica (Figuras 51-53). A espécie 3 é provavelmente associada ao complexo HbGp-CTAC, onde observamos uma recuperação da elipticidade para altas concentrações de surfactantes. A faixa de concentração de surfactante onde temos 50% da espécie 2 (Figura 59D) dos dados de CD é consistente com os dados reportados para os espectros de absorção ótica, bem como para o aumento da intensidade de espalhamento de luz. O conjunto de espectros de CD para a HbGp em função da concentração de SDS e HPS apresentou um equilíbrio de duas espécies (dados não apresentados). A espécie 1 corresponde à proteína pura (o que pode ser associado à espécie 1 dos dados de absorção ótica) e a espécie 2 ao complexo proteína-surfactante (associada à espécie 2 dos dados de absorção ótica). Vale mencionar que a concentração onde temos 50% de cada espécie para o sistema HbGp-SDS obtida dos dados de CD (0.7 mM), é menor do que a observada dos dados de absorção ótica (2 mM). Isto pode ser devido ao fato de que a mudança induzida pelo surfactante SDS na estrutura secundária da cadeia polipeptídica ocorre mais facilmente (com concentração menor de surfactante) quando comparada com as mudanças monitoradas na esfera de coordenação do ferro do grupo heme na presença de SDS (dados de absorção ótica).

Figura 59: (A) Espectros de dicroísmo circular (CD) da HbGp 0.08 mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de CTAC. (B) Espectros de dicroísmo circular das espécies puras obtidas pelo CCA. (C) Frações das espécies puras presentes no equilíbrio. (D) Inseto mostrando a região de baixa concentração de CTAC expandido.

II.4.1.3 Estudos da interação da HbGp com os diferentes surfactantes por fluorescência

Os espectros de emissão para o sistema HbGp-CTAC estão apresentados na figura 60A, enquanto que a fluorescência total normalizada para os sistemas HbGp-CTAC, HbGp-SDS e HbGp-HPS estão apresentadas na figura 60B. A adição de CTAC à hemoglobina aumenta 35 vezes a intensidade de emissão quando comparada com a proteína na sua forma nativa. A dissociação da proteína oligomérica provoca uma diminuição da supressão de fluorescência dos triptofanos devido à transferência de energia dos grupos heme. Do mesmo modo que a alcalinização do meio provoca um aumento na intensidade de fluorescência consistente com uma dissociação parcial do oligômero [115,127].

O aumento do rendimento quântico de fluorescência devido à redução da supressão de fluorescência dos triptofanos (TRP) pelos grupos heme pode ser causada pela adição de surfactante. Isto pode ser devido ao aumento na distância relativa entre os triptofanos e os grupos hemes, que são responsáveis pela supressão de fluorescência em hemoglobinas [132]. Este aumento na distância relativa entre os grupos hemes e os resíduos de triptofanos, pode envolver grupos hemes de diferentes cadeias, o que poderia indicar a dissociação oligomérica, similarmente ao observado para estudos de fluorescência da HbLt [132]. Hirsch e colaboradores sugerem a existência de mais de 500 resíduos de triptofanos na hemoglobina da *Lumbricus terrestris* (HbLt). Estes triptofanos se localizam em diferentes meios, desde vizinhanças mais polares até os de polaridade intermediária. A proporção de TRP nestes meios poderia ser dependente do estágio de dissociação da hemoglobina extracelular [132].

Foi realizada uma titulação da HbGp em função da concentração de CTAC, utilizando uma concentração maior de hemoglobina, 3 mg/ml no pH 7.0 (dados não mostrados). Para estas medidas utilizamos uma cubeta de fluorescência com caminho ótico de 1 mm. Estes resultados foram similares aos obtidos para concentrações menores de proteína, com um óbvio aumento da intensidade de espalhamento de luz e precipitação da mistura de HbGp-CTAC para a faixa de concentração de surfactante entre 0.2-2.0 mM. O aumento da concentração de CTAC, acima de 3 mM, leva à resolubilização do precipitado proteína-surfactante.

A emissão de fluorescência da HbGp 0.08mg/ml em tampão Tris-HCl pH 7.0 em função da concentração de SDS aumentou em 18 vezes na presença de 10 mM de surfactante (Figura 60B). Aparentemente, este aumento ocorre em duas etapas. Primeiro observamos um aumento de

9 vezes da intensidade de fluorescência em relação à proteína pura para concentração de SDS de até 1 mM. Após esta concentração observamos que a razão A/A_0 aumenta mais duas vezes. Desta forma, fica claro que o aumento da fluorescência na presença de SDS é mais gradual numa ampla faixa de concentração de surfactante, o que é bastante consistente com os dados apresentados de absorção ótica (Figuras 54 e 55). O espectro de emissão da HbGp na presença de HPS aumentou um fator de 20 vezes em relação à proteína pura. Assim, podemos dizer que o espectro de emissão da HbGp na presença de CTAC aumentou um fator 2 a mais do que na presença de SDS em altas concentrações.

A emissão de fluorescência da HbGp no pH 9.0 na presença dos três surfactantes apresentou um efeito menor do que o observado no pH 7.0, entretanto bastante similar quando comparado com o pH neutro. No pH 9.0 a proteína já se encontra parcialmente dissociada, o que poderia justificar o menor aumento na intensidade de fluorescência na presença dos surfactantes. Observamos um aumento de 6 vezes da fluorescência total para o CTAC, enquanto que para o HPS e SDS o aumento foi de somente 5 e 3 vezes, respectivamente. Assim, o SDS interage com a hemoglobina no pH 9.0 e pH 7.0 de forma similar. Entretanto, esta interação é menor quando comparada ao CTAC, devido ao ponto isoelétrico desta proteína ($pI = 5.5$, similar ao da HbLt, ref. 133) que favorece a interação da HbGp com o surfactante catiônico, nos valores de pH próximos da neutralidade.

Figura 60: (A) Espectros de emissão de fluorescência da HbGp 0.08 mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM no pH 7.0, em função da concentração de CTAC na faixa de concentração de 0-10 mM. (B) Áreas dos espectros de emissão, A , em função da concentração de surfactantes, normalizadas pela área da emissão do espectro da proteína na ausência de surfactante, A_0 .

II.4.1.4 Discussão geral sobre os resultados apresentados da interação da hemoglobina extracelular na presença dos surfactantes iônicos

A adição dos surfactantes catiônico CTAC, aniônico SDS e zwitteriônico HPS à hemoglobina HbGp induz dois processos diferentes: (1) a dissociação da estrutura oligomérica da proteína, que leva à exposição de resíduos de aminoácidos envolvidos nos contatos entre as subunidades; (2) a oxidação do centro metálico, originalmente na forma ferrosa. A dissociação da

proteína oligomérica é bastante clara na presença de SDS e HPS. Na presença de baixas concentrações de CTAC ocorre a formação de um precipitado proteína-CTAC. A dissociação oligomérica da HbGp pode ser confirmada pelos nossos dados de cromatografia em gel por exclusão de tamanho [117,118].

Tem sido reportado na literatura que o surfactante catiônico pode causar a redução no conteúdo da α -hélice, diminuindo a intensidade da banda de Soret e originando a oxidação da forma oxi para a forma meta [134]. De fato, nossos dados de dicroísmo circular exibem uma diminuição significativa do conteúdo da α -hélice em baixas concentrações de CTAC, indicando uma forte interação entre o CTAC e a HbGp, especialmente para concentrações baixas (Figura 59). Para maiores concentrações de CTAC observamos uma recuperação de α -hélice e a resolubilização do precipitado proteína-surfactante, originando a proteína na sua forma dissociada.

Nos valores de pH 7.0 e 9.0, os sítios aniônicos da HbGp são mais numerosos e acessíveis aos surfactantes do que os sítios catiônicos devido ao ponto isoelétrico da proteína, justificando a diferença significativa de interação entre a hemoglobina e o surfactante observada para o CTAC (carga +1), SDS (carga -1) e o HPS (carga zero). O surfactante zwitteriônico HPS poderia interagir mais intensivamente com a HbGp quando comparado ao surfactante SDS, em pH 9.0, devido a repulsão eletrostática entre o SDS e a HbGp ser maior do que no complexo HPS-HbGp. Além disso, a presença de sítios catiônicos no HPS poderia contribuir para o contato iônico entre o HPS e a HbGp. Entretanto, no pH 7.0, a interação HbGp-SDS é mais intensa do que em HbGp-HPS [117,119], apesar da maior repulsão entre o sistema HbGp-SDS. No pH 7.0, a carga total neutra do HPS poderia representar um fator significativo na interação, excluindo a atração eletrostática efetiva entre os sítios iônicos do HPS e a proteína.

A forte interação da HbGp com o CTAC poderia neutralizar vários sítios aniônicos da proteína, diminuindo a solubilidade da estrutura supramolecular da hemoglobina, originando o precipitado. A formação do par iônico entre o surfactante catiônico e os sítios aniônicos da proteína ácida poderia originar tal fenômeno. A partir dos nossos dados de CD (Figura 61) e considerando a carga total neutra do surfactante zwitteriônico, HPS, observamos que a interação eletrostática com a HbGp para o HPS é menor quando comparada com a interação da HbGp com os surfactantes aniônico e catiônico em pH neutro (pH 7.0). A figura 61 mostra que o HPS causa o menor efeito na elipticidade da HbGp, quando comparado ao CTAC e SDS. Convém mostrar

que acima de 4 mM de surfactante, para o HPS e SDS, observamos uma perda da elipticidade similar, mostrando que acima dessa concentração, a solução é saturada. Para o CTAC, observamos uma alta perda da elipticidade em 0.04 mM, regenerando a estrutura da α -hélice na faixa de 0.04-0.2 mM de CTAC, sendo que após 0.2 mM um plateau é atingido. Esta aparente saturação pode estar associada aos mecanismos de desenovelamento induzidos pelo surfactante.

Figura 61: (A) Elipticidade em 222 nm para a oxi-HbGp 0.08 mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0, em função da concentração de HPS (em preto), CTAC (em vermelho) e SDS (em verde); (B) Inserto mostrando a elipticidade para baixas concentrações de surfactantes.

Os nossos resultados enfatizam que a interação iônica prevalece quando comparada com a interação hidrofóbica entre a hemoglobina gigante HbGp e os surfactantes. De fato, é bem conhecido que esta classe de hemoglobinas apresenta o grupo heme empacotado extremamente hidrofóbico e, usualmente este heme hidrofóbico pode representar um sítio de interação apolar. Desta forma, a interação hidrofóbica com o surfactante poderia ocorrer somente após uma interação iônica significativa levando ao desenovelamento protéico, e favorecendo a acessibilidade da cadeia apolar do surfactante com os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que

são localizados ao redor do heme. Além disso, este estudo enfatiza o fato de que a interação da HbGp com os surfactantes promove um desenovelamento (dissociação oligomérica) e aumenta o processo de auto-oxidação, independente da faixa de concentração do surfactante, o que está de acordo com trabalhos prévios envolvendo estudos da interação de hemoglobinas gigantes extracelulares com surfactantes [135,136].

II.4.2 Estudos por espalhamento de luz dinâmico e absorção ótica da hemoglobina extracelular *Glossoscolex paulistus* em função do pH e da temperatura.

II.4.2.1 DLS

A Figura 62 mostra os dados de espalhamento de luz (Z-Average, diâmetro hidrodinâmico $\langle D_h \rangle_z$) da oxi-HbGp em diferentes valores de pH em função do tempo. Na faixa de pH entre 4.8 e 8.0 a proteína está em sua forma oligomérica nativa e íntegra, mostrando uma alta estabilidade (Figura 62A). O diâmetro hidrodinâmico obtido durante 72hs de monitoramento foi de 27 ± 1 nm, na temperatura estável de 25°C. Vale mencionar que estas medidas foram realizadas após o preparo da amostra e foram remedidas várias vezes durante o período de 72hs. Sendo assim, sob estas condições experimentais a alta estabilidade da proteína oligomérica foi confirmada e o tamanho da partícula não foi modificado. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos por DLS em diferentes valores de pH. Na faixa de pH 4.8-8.0 os valores de $\langle D_h \rangle$ foram obtidos para um intervalo de tempo de 1.5h (Figura 62B), enquanto que para as amostras com valores de pH maiores de 9.0, os valores de $\langle D_h \rangle$ correspondem ao fim da cinética, que é a região linear onde não ocorre mudanças significativas com a variação do tempo (Figura 62C).

A transição para valores de pH mais alcalinos induziu um processo de dissociação, resultando em partículas menores ($D_h = 10$ nm), com o alargamento do histograma da distribuição de tamanhos. O início da dissociação se deu no pH 9.0, como mostrado na figura 62C. O aumento do valor de pH, aumentou a velocidade de dissociação. Na faixa de pH 9.0-10.1, a cinética de dissociação foi facilmente monitorada por DLS. No pH 10.7, a cinética de dissociação é muito rápida (Figura 62A), e não sendo possível acompanhá-la por DLS. A figura 63 apresenta os histogramas com a distribuição de tamanhos das partículas em pH 7.0 (proteína

em sua forma nativa, $D_h = 27 \pm 1$ nm), pH 9.3 (proteína parcialmente dissociada) e pH 10.7 (proteína dissociada, $D_h = 10 \pm 1$ nm). A proteína dissociada apresenta um maior valor de polidispersão (Tabela 10). Os índices médios de polidispersão em pH 7.0 e 10.7 são 0.01 e 0.39, respectivamente. A dissociação da HbGp com o aumento do pH é evidenciada com o decréscimo do $\langle D_h \rangle$ e o aumento do índice de polidispersão. No pH 9.0, o processo de dissociação resulta no surgimento de diferentes espécies, tais como o dodecâmero, tetrâmero, trimero, linkers e monômeros, além de permanecer em solução alguma proporção de proteína nativa na sua forma não dissociada. No pH > 10, somente espécies com pesos moleculares menores tais como os trimeros, linkers e monômeros aparecem em solução (Figura 63). Experimentos com filtração em gel evidenciaram estes processos de dissociação.

Kaufman e colaboradores observaram que a dissociação alcalina da HbLt dá origem a uma mistura de complexos [137]. A dissociação da HbLt em pH > 8.0 resulta em diferentes subunidades, como os monômeros, trímeros, linkers e dodecâmeros. Estes autores observaram que este processo pode ser parcialmente reversível ao se retornar o valor do pH para 7.0; em alguns casos pode ocorrer a reassociação da proteína dissociada. Através das análises dos espectros moleculares de mobilidade eletroforética em fase gasosa das diferentes subunidades da HbLt foi possível obter o diâmetro máximo para as diferentes espécies dissociadas. Os valores encontrados de diâmetro máximo para os monômeros, linkers, trímeros, e dodecâmeros foram: 4.2, 5.0, 6.3 e 10.5, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os nossos resultados obtidos por DLS, onde observamos que para pH > 9.0, o diâmetro médio da partícula foi de 10 nm, implicando uma possível presença de dodecâmeros da HbGp em solução nestes valores de pH.

O valor de $D_h = 27$ nm obtido para a oxi-HbGp no pH 7.0 é similar aos obtidos através da técnica de SAXS para a hemoglobina extracelular da *Lumbricus terrestris* ($D_{max} = 29.4$ nm [101,138] e HbGp ($D_{max} = 30$ nm [116]. O D_{max} corresponde a dimensão máxima da partícula espalhadora.

Figura 62: Variação do diâmetro hidrodinâmico (D_h) em função do tempo para $[HbGp]=0.5$ mg/ml em diferentes valores de pH, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, em $T=25^\circ\text{C}$ (A) Medidas de DLS realizadas no intervalo de 72h. (B) Cinética inicial para o intervalo de 1.5h. (C) Medidas de DLS realizadas num período de 24hs, mostrando a cinética na faixa de pH de 9.0 -10.1.

Figura 63: Distribuição dos tamanhos das partículas dos dados obtidos por DLS, [HbGp]=0.5 mg/ml, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM nos valores de pH 7.0, 9.3 e 10.7, obtidos dos dados apresentados na figura 62, utilizando o método dos cumulantes. As barras de erros correspondem aos desvios de 15 medidas diferentes. As barras de erros para a distribuição no pH 9.3 são maiores devido a grande variação do tamanho das partículas ao longo do experimento.

Tabela 10: Valores de diâmetro hidrodinâmico $\langle D_h \rangle$ Z-Average, coeficiente de difusão e índice de polidispersão obtidos através dos dados de DLS da hemoglobina extracelular de *G. paulistus* na sua forma oxi em diferentes valores de pH.

pH	$\langle D_h \rangle$ (nm)	D_z (m ² /s) $\times 10^{-12}$	Polidispersão (%)
4.8	28 ± 1	1.77	0.01
5.4	28 ± 1	1.78	0.01
6.1	27 ± 1	1.79	0.01
7.0	27 ± 1	1.79	0.01
8.0	27 ± 1	1.80	0.01
9.0	10 ± 1	4.92	0.30
9.3	10 ± 1	4.92	0.32
9.6	10 ± 1	4.92	0.31

10.1	10 ± 1	5.02	0.35
------	------------	------	------

II.4.2.2 Cromatografia em gel por exclusão de tamanho da HbGp em diferentes valores de pH

Na figura 64 estão apresentados os cromatogramas obtidos por cromatografia em gel por exclusão de tamanho para as amostras de HbGp (6.0 mg/ml) em três diferentes valores de pH. Como podemos observar na figura 64A, no pH 7.0, a proteína nativa é eluída no volume de exclusão da coluna, apresentando um único pico estreito (fração 1). Isto é consistente com observações prévias da estabilidade oligomérica significativa no pH neutro, e com os dados apresentados de DLS apresentados anteriormente (Figura 62A). A alcalinização das soluções de proteína leva a uma redução significativa do pico referente à proteína nativa eluída em $V/V_0=1$, e um simultâneo aparecimento dos picos correspondentes às espécies de massas moleculares menores (Figura 64 B e C). A Fração V destes cromatogramas corresponde ao monômero d, o qual foi caracterizado recentemente por MALDI-TOF-MS [108]. As frações II e III são, provavelmente, associadas com os agregados que contem o grupo heme, como pode ser visto pelo alto valor de absorção em 415 nm. Nós acreditamos que exista uma quantidade significativa de dodecâmeros, trímeros, e monômeros incluídos nestas frações. Finalmente, a fração IV é provavelmente rica em linkers, pois a absorção em 415 nm, associada aos grupos heme, é bastante baixa, comparável com a absorção em 280 nm, associada à proteína.

Figura 64: Cromatogramas da HbGp 6 mg/ml obtidos pela filtração em gel de Sephadex G-200 em tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 (A), pH 9.0 (B) e pH 9.6 (C). Absorção no comprimento de onda em 280 nm (círculos) e 415 nm (quadrados). Os números I, II, III, IV e V correspondem às diferentes espécies obtidas pela dissociação alcalina (ver texto). Todos os cromatogramas foram obtidos a 25°C.

II.4.2.3 Cinética de dissociação por DLS

Diferentes modelos cinéticos de dissociação de proteínas são possíveis. Entretanto, no presente trabalho foi utilizado um modelo simples de equilíbrio químico. Sendo assim, consideramos que todas as etapas no processo são irreversíveis, e as soluções analíticas tornam-se somas de termos exponenciais. Assim, o modelo bem geral, considerado no nosso estudo, é

caracterizado pela dissociação alcalina do dodecâmero em tetrâmero, seguida pela dissociação do tetrâmero em trímero e monômero, ou seja:

HbGp corresponde à proteína na sua forma nativa, $(\text{abcd})_3\text{L}_3$ corresponde a uma fração 1/12 da molécula de proteína, $(\text{abcd})_3$ corresponde ao dodecâmero, (abcd) ao tetrâmero, (abc) ao trímero (d) ao monômero. Esta suposição foi feita com base na recente caracterização parcial das massas moleculares das subunidades da HbGp por MALDI-TOF-MS, onde observamos a existência de monômeros, trímeros e linkers [108]. Por outro lado, este equilíbrio da HbGp pode ser baseado também nos estudos da HbLt relatados na literatura [109,110]. Dessa forma, o nosso modelo pode ser considerado como uma aproximação simples, que poderá ser modificado no futuro em estudos posteriores. Baseado no modelo de dissociação oligomérica descrito nas equações 34-36, uma equação para a cinética de dissociação foi deduzida com o objetivo de se ajustar os dados experimentais do coeficiente de difusão médio, D_z , em função de tempo [120]:

$$D_z = \frac{(M_p^2 D_p - BD_\infty)e^{-kt} + BD_\infty}{(M_p^2 - B)e^{-kt} + B} \quad (37)$$

Onde M_p é a massa da proteína na sua forma nativa, D_p é o coeficiente de difusão médio da proteína na forma nativa, D_∞ é o coeficiente de difusão médio da proteína dissociada, k é a constante cinética de dissociação.

A cinética de dissociação em pH 9.0 é bastante lenta ($5.06 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Tabela 11)) completando-se praticamente, após 24hs. A cinética de dissociação torna-se mais rápida progressivamente com o aumento dos valores de pH ($138 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ no pH 10.1 (Tabela 11)), no pH 10.7 não foi possível determinar a constante cinética de dissociação por DLS. Os valores de

D_h , coeficiente de difusão, e polidispersão para HbGp em diferentes valores de pH são apresentados na Tabela 10. O coeficiente de difusão e o diâmetro hidrodinâmico médio, obtidos a partir da relação Stokes-Einstein (eq. 33), mudam na faixa de pH entre 8.0 e 9.0. Os dados experimentais de cinética de dissociação determinados por DLS são mostrados na Figura 62 e foram usados para os valores correspondentes de coeficientes de difusão. A figura 65 apresenta estes resultados experimentais com os ajustes das curvas cinéticas realizados pela equação 37 [120]. Na Tabela 11 temos os valores encontrados das constantes cinéticas de dissociação, obtidos através dos gráficos do coeficiente de difusão em função do tempo.

Figura 65: Curvas cinéticas de dissociação da oxi-HbGp e os respectivos ajustes obtidos a partir dos dados de DLS em função do tempo no tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, em diferentes valores de pH com $T=25^{\circ}\text{C}^{\circ}$ e $[\text{HbGp}]=0.5$ mg/ml. As curvas cinéticas de dissociação da HbGp foram ajustadas pela equação 37 para obter os valores característicos de k (constante de velocidade). Todos os parâmetros de ajustes estão apresentados na Tabela 11.

Um comportamento monoexponencial foi observado no pH 9.0, e isto é devido ao fato de que a hemoglobina, provavelmente, esta na forma mais estável quando comparada com pH mais alcalino. Acima do pH 9.0, $\langle D_h \rangle$ decresce gradualmente como mencionado anteriormente, originando espécies com menor massa molecular. De fato, o decréscimo do $\langle D_h \rangle$ de 27 para 10 nm, sugere a dissociação completa da HbGp em trímeros, linkers e monômeros.

Um aumento significativo na constante de velocidade foi observado com o aumento do pH (Tabela 11): no pH 10.1, $k = (138 \pm 20) \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$, a constante é um fator 28 vezes maior do que no pH 9.0, $k = (5.06 \pm 0.06) \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$. Todas as curvas experimentais foram bem ajustadas pela equação 37, baseada numa cinética de dissociação monoexponencial. Entretanto, espécies intermediárias podem estar presentes no equilíbrio de dissociação. Os nossos dados de DLS não nos permitem determinar as constantes associadas às etapas intermediárias. Dessa forma, os valores de k obtidos neste estudo estão relacionados com todas as fases, sendo descritos por um único valor de k consistente com o modelo simples de dissociação proposto acima.

Recentemente, estudos de SAXS da HbGp no pH 9.0 [116], sugerem que a hemoglobina se dissocia em trímeros e monômeros, o que foi considerado como o fator responsável pela natureza bifásica na cinética de autooxidação da HbGp [139].

Tabela 11: Constantes cinéticas de dissociação da HbGp em diferentes valores de pH obtidos dos dados de DLS em $T=25^\circ\text{C}$.

Parâmetros*	pH			
	9.0	9.3	9.6	10.1
$k (\times 10^{-5} \text{s}^{-1})$	5.06 ± 0.06	16.5 ± 0.2	48 ± 2	138 ± 20
$D_\infty (\times 10^{-12} \text{m}^2\text{s}^{-1})$	4.92	4.92	5.269 ± 0.008	5.43
$X_0 (\text{s})$	-31530 ± 944	-10330 ± 301	-5628 ± 323	-3430 ± 669
R^2	0.973	0.992	0.942	0.816
Pontos experimentais	463	298	297	35

*As definições dos parâmetros estão apresentadas no texto acima. X_0 corresponde ao deslocamento de tempo na origem e R^2 é o coeficiente de correlação do ajuste. O valor de $M_p = 3.1 \times 10^6 \text{ Da}$, $D_p = 1.8 \times 10^{-12} \text{m}^2\text{s}^{-1}$ e $B = 1.33 \times 10^{11} \text{ Da}^2$ foram utilizados em todos os ajustes dos dados experimentais.

II.4.2.4 Estudo da dissociação e desnaturação da proteína HbGp em diferentes valores de temperatura por DLS – Ponto de fusão (“Melting point”)

As proteínas são biomoléculas carregadas que podem se enovelar em estruturas compactas que são muito sensíveis às condições da solução. Um exemplo é a desnaturação térmica que pode levar a perda irreversível da estrutura e função da molécula. A desnaturação térmica pode levar a um aumento da dimensão da partícula e isso pode ser controlado por dispersão de luz dinâmica. O “ponto de fusão” da proteína (“melting point”) é marcado por um aumento no tamanho do diâmetro hidrodinâmico e da intensidade de luz espalhada. Esta temperatura de ponto de fusão da proteína é um indicativo da estabilidade térmica de uma proteína. As modificações (tal como desnaturação e/ou dissociação) podem influenciar a estabilidade e são observados facilmente usando espalhamento de luz dinâmico.

Quando uma proteína é aquecida acima de seu ponto térmico característico de estabilidade (ponto de fusão da proteína), um desenovelamento significativo leva à exposição das cadeias hidrofóbicas e pode causar agregação irreversível. A técnica de espalhamento de luz é ideal para estudar o “melting point” de proteínas, pois é extremamente sensível a objetos que tem grande espalhamento, bem como a agregados e proteínas desnaturadas. Mudanças semelhantes de estrutura podem acontecer controlando-se o tempo, pH, força iônica bem como mudanças em várias outras condições de solução. Sendo assim, espalhamento de luz é uma ferramenta ideal para avaliar as condições da macromolécula em solução [140].

O efeito da temperatura na dissociação e desnaturação da HbGp na forma oxi foi estudada em diferentes valores de pH, principalmente nos valores de pH onde a proteína encontra-se bastante estável, para que não tivéssemos a contribuição de dois efeitos simultâneos, o da temperatura e do pH do meio.

A Figura 66 mostra as curvas de “melting point” com os valores de D_h em função da temperatura para a HbGp 0.05mg/ml em diferentes valores de pH. Na figura 66A, podemos observar que na faixa de pH 4.8-6.1 o aumento da temperatura não induziu a dissociação da HbGp. Para valores de pH 5.4 e 6.1, acima e abaixo do ponto isoelétrico (pI) desta classe de proteína, a HbGp desnatura-se a $T=55^\circ\text{C}$, formando agregados e precipitando. O valor de D_h na temperatura abaixo de 55°C é $\sim 27\pm 1$ nm, como encontrado na proteína na sua forma nativa. No pH 4.8, o qual esta abaixo do pI da HbGp (pI=5.5, assumindo ser igual ao da HbLt [133]), a

proteína desnatura-se em temperatura menor ($T=52^{\circ}\text{C}$), sem a formação de agregados grande e precipitados. O valor de $\langle D_h \rangle$ máximo acima de 52°C para o pH 4.8 (260 nm) é menor do que no pH 6.1 e 5.4, 2650 e 3000 nm, respectivamente. O processo observado foi essencialmente irreversível, como pode ser deduzido do fato dos valores de diâmetro hidrodinâmico não modificarem após o resfriamento da amostra para $T=20^{\circ}\text{C}$ (dados não mostrados).

Na figura 66B observamos que a HbGp em pH 7.0 é extremamente estável, até 52°C a proteína não se dissociou, após a temperatura de 52°C ocorreu a desnaturação da proteína, formando um complexo de $D_h=65$ nm. Como mencionado acima, a temperatura crítica foi definida em 52°C no pH 7.0, onde a dimensão da partícula espalhadora mudou drasticamente (Tabela 12). Na faixa de pH 7.5-8.3, onde não foi observado uma dissociação oligomérica da proteína com a alcalinização do meio na temperatura ambiente, observamos que o aumento da temperatura provoca uma dissociação da proteína, seguida pela desnaturação. A proteína nativa com um valor de D_h de 27 nm transforma-se em partículas pequenas com valores de D_h menor. Valor alto de pH corresponde a menor temperatura onde a proteína começa a se dissociar. As temperaturas críticas para a dissociação (T_{diss}) e desnaturação (T_{den}) são apresentadas na Tabela 12 juntamente com os valores de D_h observados nestas temperaturas. Portanto, quanto mais alcalino estiver o meio, mais a dissociação será favorecida. As intensidades de espalhamento de luz nos pHs 7.0 e 8.0 são relativamente altas devido ao fato da proteína, nestas condições, encontrar-se na sua forma nativa e estável, ou seja, não temos a dissociação da proteína em pequenas frações oligoméricas. Esses dados de “melting point” estão de acordo com resultados apresentados na figura 62 sobre a estabilidade da HbGp em diferentes valores de pH. O aumento do valor de pH de 7.5 para 8.3, decresce o valor de T_{diss} de 44°C para 32°C . Os valores de $\langle D_h \rangle$ na temperatura mais alta (65°C) são maiores no pH 7.0 (mínimo de 65 nm) quando comparado com os valores de pH mais alcalino 7.5-8.3 (25-16 nm). Isso indica que a dissociação da proteína com o aumento da temperatura é um processo irreversível.

Bonafé e colaboradores [141] estudaram os mecanismos de reassociação da HbGp, argumentando que a irreversibilidade do processo de dissociação da proteína é devido às mudanças conformacionais que ocorrem nas formas intermediárias. Esses autores propuseram que após a dissociação, as espécies dissociadas apresentam uma mudança conformacional que prejudica a eficiência da reassociação. Provavelmente, esta dificuldade com a reassociação é uma consequência do decréscimo dos contatos intercadeias polipeptídicas, especialmente de natureza

eletrostática, em função da alteração do arranjo espacial da proteína [141]. Cioni e Strambini [142] propuseram que as mudanças conformacionais inibem a reassociação das subunidades, implicando a irreversibilidade do processo de dissociação. Isto poderia explicar o porque de fatores não protéicos, como a ligação de íons cálcio pode promover, em alguns casos, uma pequena reassociação das subunidades oligoméricas [109,141]. Os íons cálcio podem se ligar ao centro de coordenação metálico, induzindo a formação de vários contatos entre os sítios básicos na proteína, os quais foram eliminados após as mudanças conformacionais associadas aos processos de dissociação, favorecendo a reorganização da hemoglobina gigante [111]. Estudos focando processos de dissociação da HbLt demonstraram que, na ausência de cátions divalentes, a reassociação é bastante limitada, geralmente menor do que 10% [124]. Entretanto, Kuchumov e colaboradores estudaram o efeito dos linkers na reassociação da HbLt. Eles encontraram quatro diferentes subunidades de linkers da HbLt que são responsáveis pela auto-agregação no pH neutro, originando dímeros e multímeros. A combinação binária e ternária, e a mistura nativa original exibem uma agregação extensiva envolvendo as subunidades que contém heme e as que não possuem o grupo heme (linkers) [100]. Esta agregação das subunidades é certamente uma forte limitação para a reassociação da proteína oligomérica nativa. Entretanto, a forte dependência da dissociação da proteína com os ligantes e o estado de valência do ferro do grupo heme é bem estabelecida, e a espécie férrica é mais instável aos processos de dissociação do que a espécie ferrosa [99,111]. A auto-oxidação do grupo heme poderia inibir os processos de reassociação das subunidades.

Figura 66: Efeito da temperatura no diâmetro hidrodinâmico da HbGp 0.5 mg/ml em diferentes valores de pH, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, na faixa ácida (A) e na faixa alcalina (B) de valores de pH. Os parâmetros críticos (temperaturas e tamanhos) estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de tamanhos e temperaturas críticas referentes ao efeito da temperatura nos valores de diâmetro hidrodinâmico da oxi- HbGp em diferentes valores de pH, obtidos em experimentos de “melting point” descritos na Figura 66.

pH	T _{diss} (°C)	<D _h > _(diss) (nm)	T _{Den} (°C)	<D _h > _(den) (nm)
4.8	-	-	50±1	260±20
5.4	-	-	55±2	3000±30
6.1	-	-	56±2	2650±27
7.0	-	-	52±1	65±6
7.5	44±1	27±1	49±1	25±1
7.8	39±1	27±1	46±1	20±1
8.3	32±2	27±1	40±1	16±1

T_{diss}= Temperatura crítica de dissociação; T_{den}= Temperatura crítica de desnaturação; <D_h>_(diss)= diâmetro hidrodinâmico médio onde começa o processo de dissociação; <D_h>_(den)= diâmetro hidrodinâmico médio em T=65°C.

II.4.2.5 Absorção ótica

Acompanhamos também as mudanças espectrais da HbGp em função do pH através de absorção ótica. Os espectros da Figura 67A foram obtidos após 2h da preparação da amostra, e os espectros da Figura 67C foram obtidos depois de 24 h de incubação da amostra no pH indicado. Não foram observadas mudanças espectrais na banda de Soret e nas Bandas Q (β e α) após 24 hs de incubação para os valores de pH onde a proteína encontra-se estável (pH 6.1-8.4). Por outro lado, em valores de pH acima de 9.0, observamos uma diminuição e alargamento da Banda de Soret e um deslocamento para o azul, assim como alargamento das duas bandas Q e um aumento da relação entre as suas intensidades, indicando a oxidação do centro ferroso. O surgimento da banda alargada (LMCT) (banda de transferência de carga ligante-metal) em 620 nm caracteriza a formação de uma espécie férrica pentacoordenada (Figura 67 B e D). Desta forma, o comportamento espectral da HbGp em função do pH é consistente com o processo de auto-oxidação que ocorre para valores > 9.0. Estes efeitos são característicos de dissociação e auto-oxidação de HbGp [119,139].

II.4.2.6 Cinética de auto-oxidação acompanhada por Absorção ótica

O processo cinético de auto-oxidação foi monitorado em diferentes valores de pH na faixa de 9.0-9.3, em T= 25°C e 38°C. Para obter a constante de velocidade da auto-oxidação, foi monitorada a absorbância em 415 nm em função do tempo. Os dados coletados foram ajustados como uma cinética de primeira ordem, como descrito por Poli e colaboradores [119]:

$$A_t = A_1 + (A_0 - A_1) \cdot \exp[-(x - x_0)/t_1] \quad (38)$$

Nesta equação, A_t é a absorbância no tempo t , A_0 é a absorbância no tempo inicial e A_1 é a absorbância no tempo infinito. A constante de velocidade é dada por $k=1/t_1$.

O aumento no valor do pH, leva a um aumento na velocidade da reação de auto-oxidação para ambas as temperaturas. As constantes de velocidade em função do pH, e nas duas diferentes temperaturas são apresentadas nas tabelas 4 e 5.

Estudos prévios de auto-oxidação da HbGp no pH 9.0 a 38°C mostraram que a cinética pode ser descrita como um processo bi-exponencial, caracterizado por uma constante de velocidade rápida e outra lenta. A constante rápida foi associada com a oxidação do heme do trímero (*abc*), enquanto que o processo lento é associado à oxidação do grupo heme presente no monômero *d* [119]. Na figura 68A e na Tabela 13, exemplos de curvas cinéticas e dados cinéticos obtidos da HbGp a 25°C são apresentados. A cinética no pH 9.0 e 9.3 é monoexponencial, sendo a constante de velocidade no pH 9.0 igual a $k=(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Este valor é um fator 25 vezes menor do que o processo rápido e um fator 5 vezes menor do que o processo lento no pH 9.0 a 38°C (Tabela 14 e Figura 69). A partir do pH 9.6, a 25°C, a cinética de auto-oxidação da HbGp torna-se bi-exponencial (Figura 68A) e a constante de velocidade do processo rápido aumenta no pH 9.8 de um fator 10 quando comparada com o valor obtido no pH 9.0 (Tabela 13). Por outro lado, em T=38°C, a cinética é bi-exponencial para toda faixa de pH estudada, e os valores de k estão apresentados na Tabela 14. Os valores de k monitorados por DLS são um fator de 2.7-4.8 maiores do que os valores encontrados por absorção ótica (auto-oxidação). Os experimentos de auto-oxidação, monitoram a acessibilidade do grupo heme em relação ao solvente, especialmente a água e ligantes hidroxilas, capazes de induzir mudanças na esfera de coordenação do ferro. Dessa forma, este processo está ligado a estabilidade da estrutura oligomérica da proteína,

enquanto que as medidas de DLS são sensíveis num primeiro momento ao tamanho médio das partículas espalhadoras.

Figura 67: Espectros de absorção ótica da proteína nativa oxi-HbGp na faixa de pH 6.1 – 9.9, mostrando as mudanças espectrais nas bandas de Soret (A e C) e na região das bandas Q e LMCT (B e D). Estes espectros correspondem às medidas das amostras após 2h do preparo (A e B) e após 24 h de incubação (C e D).

Nossos dados sugerem que a dissociação precede a auto-oxidação, desde que os valores de k obtidos dos dados de DLS (Tabela 11) são maiores do que os observados por UV-vis (Tabela 13). O processo que prevalece inicialmente é a dissociação oligomérica, o que leva na

seqüência, a uma auto-oxidação mais pronunciada devido à maior acessibilidade do grupo heme ao solvente água. Isso poderia explicar a maior constante de velocidade obtida pelos dados de DLS quando comparada com os valores de k obtidos por UV-vis. Entretanto, após o processo inicial de auto-oxidação, um efeito cooperativo pode ocorrer devido à menor estabilidade oligomérica da espécie férrica comparada com a forma oxidada das hemoglobinas gigantes extracelulares [99,109].

Desta forma, uma seqüência de eventos pode ser proposta na seguinte ordem: 1) dissociação inicial; 2) seguida de auto-oxidação e 3) com mais dissociação. Entretanto, na primeira etapa, o processo de dissociação inicial induzido pela perturbação do meio prevalece; na segunda etapa, o processo de auto-oxidação torna-se predominante, seguido na terceira etapa pela dissociação adicional devido à menor estabilidade da estrutura oligomérica da espécie oxidada (metahemoglobina).

Figura 68: Cinéticas de auto-oxidação da oxi-HbGp monitorados por absorção ótica. Absorbância em 415 nm em função do tempo, em tampão tris-HCl 30 mM, em diferentes valores de pH, [HbGp]=0.5 mg/ml; T=25°C (A) e T=38°C (B).

Tabela 13: Constantes cinéticas para a auto-oxidação da HbGp em T=25°C.

pH	$k_{\text{obs1}} (\times 10^{-5} \text{ s}^{-1})$	$k_{\text{obs2}} (\times 10^{-5} \text{ s}^{-1})$	$\Delta A_1 \times 10$	$\Delta A_2 \times 10$	% ΔA_1
9.0	1.8 ± 0.2		7.1 ± 0.6		
9.3	3.54 ± 0.04		7.1 ± 0.2		
9.6	10 ± 2	0.88 ± 0.02	5.1 ± 0.2	2.4 ± 0.2	68 ± 4
9.8	13.2 ± 0.3	1.03 ± 0.07	5.5 ± 0.4	2.9 ± 0.2	65 ± 5

k_{obs1} e k_{obs2} corresponde aos processos rápido e lento, respectivamente. ΔA_1 e ΔA_2 correspondem às amplitudes dos dois processos. % ΔA_1 corresponde a contribuição do processo rápido, $(\Delta A_1/(\Delta A_1 + \Delta A_2)) \times 100\%$.

Tabela 14: Constantes cinéticas para a auto-oxidação da HbGp em T=38°C.

pH	$k_{\text{obs1}} (\times 10^{-4} \text{ s}^{-1})$	$k_{\text{obs2}} (\times 10^{-4} \text{ s}^{-1})$	$\Delta A_1 \times 10$	$\Delta A_2 \times 10$	% ΔA_1
9.0	4.80 ± 0.06	0.88 ± 0.01	5.3 ± 0.1	0.11 ± 0.2	98 ± 2
9.3	7.0 ± 0.7	1.9 ± 0.1	4.8 ± 0.1	0.10 ± 0.1	98 ± 1
9.6	16.0 ± 0.8	3.10 ± 0.01	4.1 ± 0.2	1.8 ± 0.3	69 ± 3
9.8	22.0 ± 1.0	3.5 ± 0.2	3.8 ± 0.4	2.0 ± 0.1	65 ± 5

k_{obs1} e k_{obs2} correspondem aos processos rápido e lento, respectivamente. ΔA_1 e ΔA_2 correspondem às amplitudes dos dois processos. % ΔA_1 corresponde a contribuição do processo rápido, $(\Delta A_1/(\Delta A_1 + \Delta A_2)) \times 100\%$.

Figura 69: Constantes de velocidade, k_{obs} , nos valores de pH 9.0, 9.3, 9.6 e 9.8 obtidos dos dados de cinética de auto-oxidação da oxi-HbGp 0.5 mg/ml. A absorbância em 415 nm foi monitorada em função do tempo em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, em $T=25^{\circ}\text{C}$ e 38°C . As constantes cinéticas, k , obtidas dos dados de DLS mostrados na figura 65 estão incluídas para comparação.

II.4.2.7 Discussão geral dos resultados de espalhamento de luz dinâmico e absorção ótica da HbGp em função do pH e da temperatura.

Neste estudo observamos a estabilidade da HbGp em termos da dissociação alcalina e efeito da temperatura. Os resultados de DLS mostraram que a estrutura oligomérica da proteína é mais estável na faixa de pH 4.8-8.0, começando o processo de dissociação para valores de pH maiores do que 9.0. O diâmetro hidrodinâmico é de 27 nm na faixa de pH 4.8-8.0, decrescendo para 10 nm no pH 10.7. A cinética de dissociação foi monitorada na faixa de pH de 9.0-10.1 em $T=25^{\circ}\text{C}$, mostrando um comportamento monoexponencial para os dados de coeficiente de difusão médio com base em um modelo simples de dissociação. Estudos de DLS em função da temperatura mostraram que a HbGp é bastante estável no pH ácido, desnaturando-se na temperatura acima de 55°C . Na faixa de pH 7.5-8.3 a proteína primeiro dissocia-se na faixa de

temperatura de 32-45°C, sendo que a menor temperatura de dissociação corresponde ao maior valor de pH. Após a dissociação, o aumento de 8-10°C favorece a desnaturação. No pH 7.0 a dissociação não é observada e a desnaturação ocorre em T=52°C.

A cinética de auto-oxidação da HbGp foi monitorada na faixa de pH 9.0-9.8 em T=25°C e 38 °C. Em T=25°C e no pH 9.0 e 9.3 a cinética é monoexponencial, sendo que o aumento do valor de pH torna a cinética biexponencial. Em T=38 °C a cinética é biexponencial para toda a faixa de pH. Através das análises dos dados apresentados acima, nós concluímos que a dissociação monitorada por DLS é mais rápida quando comparada com a auto-oxidação do heme. Entretanto, os dois processos de dissociação oligomérica e auto-oxidação do heme são interdependentes para esta classe de hemoglobinas. O efeito reverso, ou seja, a auto-oxidação após a dissociação oligomérica é menos pronunciada, desta forma a cinética de dissociação monoexponencial é observada por DLS em todas as condições. Neste trabalho mostramos que DLS pode ser utilizado para quantificar em tempo real, as mudanças cinéticas na oligomerização de complexos biológicos supramoleculares. A caracterização da estabilidade da HbGp e a desestabilização da estrutura quaternária induzida pelo pH e temperatura, bem como os efeitos recíprocos, são muito importantes para desenvolver sistemas miméticos desta classe de proteínas que vem sendo testados afim de ser usados como substituto sanguíneo

PARTE III

III.1 Conclusões

III.1.1 Conclusão geral envolvendo os estudos de porfirinas e hemoglobina

Na primeira parte desta tese de doutorado realizamos diferentes estudos envolvendo a interação de duas porfirinas aquo-solúveis, a porfirina catiônica TMPyP, e a aniônica TPPS₄, na presença de diferentes modelos biomiméticos. A porfirina aniônica TPPS₄ interage fortemente com as micelas catiônicas de CTAC. Observamos através das análises das curvas de SAXS que a presença da TPPS₄ nas micelas de CTAC induz uma diminuição no raio parafínico, diminuindo o número de agregação da micela catiônica. Entretanto, a presença da porfirina aniônica, de modo geral, não modifica a forma das micelas de CTAC. Esta observação sugere que algumas porfirinas podem se localizar dentro da camada de Stern (interface polar) da micela e a maior parte das porfirinas pode se acomodar paralelamente na forma de uma camada na superfície da micela. A interação da porfirina catiônica com micelas de SDS se dá exclusivamente por interações eletrostáticas. A presença da TMPyP nas micelas de SDS não modifica nenhum parâmetro estrutural da micela, ou seja, não foi observada nenhuma mudança na forma ou tamanho das micelas. Observamos através das análises de SAXS que a presença da TMPyP nas micelas de SDS diminui o coeficiente de ionização, causando a neutralização parcial das cargas da cabeça polar das micelas pela porfirina, refletindo numa menor repulsão intermicelar.

Através de um estudo de supressão de fluorescência das duas porfirinas na presença de diferentes micelas de surfactantes, em diferentes valores de pH e temperatura, foi possível propor a localização das porfirinas nas micelas iônicas, zwitteriônicas e neutras utilizando um supressor iônico, iodeto de potássio (KI). Os resultados obtidos são consistentes com os dados de SAXS. Observamos que o caráter hidrofóbico da TPPS₄ é muito maior do que o da TMPyP. Isto pode estar relacionado com o fato de que as cargas positivas da porfirina catiônica são mais delocalizadas por todo o anel porfirínico, devido ao efeito de ressonância dos grupos metilpiridil em oposição à carga negativa dos grupos sulfonatos da porfirina aniônica nos substituintes ser bem mais localizada. Esta menor densidade de carga dos grupos substituintes da porfirina catiônica, em função da delocalização para o anel porfirínico, explica a menor constante de

associação da TMPyP com as micelas de SDS comparada ao sistema CTAC-TPPS₄, além do maior efeito causado nas micelas de CTAC pela presença de TPPS₄ do que nas micelas de SDS devido a TMPyP. Como mencionado anteriormente, na porfirina aniônica a carga iônica nos substituintes é mais pontual nos sítios de interação (grupos sulfonatos), justificando a interação eletrostática mais efetiva da TPPS₄ com os surfactantes catiônicos.

Assim, os nossos dados de supressão sugerem que os valores de constante de supressão bimolecular k_q utilizando como supressor o íon iodeto, são bastante dependentes da cabeça polar do surfactante. Desta forma, apesar da constante de associação entre o par TPPS₄-CTAC ser um fator 5 vezes maior em comparação com o sistema TMPyP-SDS, os valores de k_q para o I⁻ suprimir a fluorescência da TPPS₄ na presença de CTAC é um fator 10 maior em comparação com o sistema TMPyP-SDS. Isto se deve, à atração do supressor aniônico com a carga positiva do CTAC e a repulsão do mesmo pela carga negativa do SDS. Este efeito leva a uma maior concentração de ânions iodeto na interface micelar do CTAC quando comparada ao SDS. Comparando os valores de k_q para ambas as porfirinas em micelas de TX-100 observamos claramente que a interação da TMPyP com esta micela não é significativa, enquanto que para a TPPS₄ observamos uma redução significativa no valor de k_q em comparação com a porfirina pura em tampão, justificada pela sua forte interação (da TPPS₄) com a micela neutra.

Na seqüência foram realizados estudos espectroscópicos da TPPS₄ e a TMPyP em função da concentração de micelas mistas de 60%CTAC+40%TX-100 e 80%SDS+20%TX-100, respectivamente. Observamos que a presença de micelas mistas não eliminou a formação de agregados pré-micelares observados em estudos anteriores com os micelas iônicas puras. Entretanto, a adição direta de TX-100 nos agregados pré-micelares de porfirina-surfactante de carga oposta para concentração relativamente alta de surfactante neutro provocou a resolubilização deste agregado nas micelas.

Já a interação da TMPyP com vesículas mistas de POPC+POPG não apresentou a formação destes agregados. Uma interação significativa da porfirina catiônica com os fosfolipídios aconteceu somente na presença do lipídio aniônico. Esta observação comprova que a TMPyP interage somente por forças eletrostáticas com os sistemas modelos estudados no presente trabalho.

Na segunda parte desta tese estudamos uma hemoproteína gigante extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) na presença de diferentes surfactantes. Observamos que a adição

dos surfactantes catiônico CTAC, aniônico SDS e o zwitteriônico HPS na solução da HbGp induziu dois processos diferentes. O primeiro processo corresponde a dissociação da estrutura oligomérica da proteína, o que leva à exposição de resíduos de aminoácidos envolvidos nos contatos entre as subunidades. O segundo processo está relacionado com a oxidação do centro metálico, originalmente na forma ferrosa. A dissociação da proteína oligomérica é bastante clara na presença de SDS e HPS. Na presença de baixas concentrações de CTAC ocorreu a formação de um precipitado proteína-CTAC, o qual foi resolubilizado para maiores concentrações de CTAC. Observamos que a interação do HPS com a HbGp é menos intensa do que a interação desta hemoglobina com os surfactantes catiônico e aniônico. Isso pode ser justificado dentre outros fatores pelo ponto isoelétrico ácido (pI) da HbGp. Os sítios aniônicos da HbGp são mais numerosos e acessíveis aos surfactantes nos pHs 7.0 e 9.0 do que os sítios catiônicos devido ao ponto isoelétrico da proteína, justificando a diferença significativa de interação entre a hemoglobina e o surfactante observada para o CTAC (carga +1), SDS (carga -1) e o HPS (carga zero).

Através da técnica de DLS, foi possível a realização de um estudo cinético da dissociação da HbGp em diferentes valores de pH. Observamos que para valores de pH mais altos, a cinética de dissociação alcalina é acelerada. A proteína nativa no pH 7.0 é extremamente estável, apresentando um diâmetro médio da partícula espalhadora de 27 nm, o que está de acordo com resultados prévios obtidos através de SAXS. O aumento do valor do pH, na faixa de pH 9.0-10.7, produziu a dissociação oligomérica, dando origem a diferentes espécies em equilíbrio com massas moleculares menores. A dissociação alcalina dá origem a dodecâmeros, trímeros, linkers e monômeros, e o tamanho médio encontrado para estas partículas foi de 10 nm.

O aumento da temperatura na faixa de pH ácido (4.8-6.1) provocou a desnaturação da proteína (em $T > 55^{\circ}\text{C}$) com a formação de agregados e precipitados. No pH 7.0, a proteína nativa é bastante estável até 52°C , sendo que acima desta temperatura a proteína desnatura-se, originando agregados com o tamanho de 65 nm. Na faixa de pH 7.5-8.3 observamos que o aumento da temperatura causou a dissociação da hemoglobina, e aumentando cerca de $8-10^{\circ}\text{C}$, a proteína desnatura-se.

Através de medidas de absorção ótica, acompanhamos o processo de auto-oxidação do heme na faixa de pH alcalino (9.0-10) em duas temperaturas distintas, 25 e 38°C . O aumento da temperatura e do pH favorece a auto-oxidação, assim como a dissociação da HbGp. Concluimos

então que a dissociação monitorada por DLS é mais rápida quando comparada com a auto-oxidação do heme. Entretanto, os dois processos de dissociação oligomérica e auto-oxidação do heme são interdependentes para esta classe de hemoglobinas. O efeito reverso, ou seja, a auto-oxidação após a dissociação oligomérica é menos pronunciado. Neste trabalho mostramos que DLS pode ser utilizado para quantificar em tempo real, as mudanças cinéticas na oligomerização de complexos biológicos supramoleculares. A caracterização da estabilidade da HbGp e a desestabilização da estrutura quaternária induzida pelo pH e temperatura, bem como os efeitos recíprocos, são muito importantes para desenvolver sistemas miméticos desta classe de proteínas para serem usados como substituto sanguíneo. Esta questão vem sendo estudada em vários laboratórios europeus e americanos.

PARTE IV

IV.1 Perspectivas futuras

Pretendemos finalizar o estudo da interação das porfirinas TPPS₄ e TMPyP com micelas mistas, utilizando diferentes razões de surfactante iônico e o neutro, com o objetivo de verificar se a presença de micelas mistas desfavorece a formação dos agregados pré-micelares de TPPS₄-CTAC e TMPyP-SDS.

Do mesmo modo pretendemos concluir o estudo envolvendo a TMPyP com as vesículas de fosfolipídios. E para compararmos o efeito eletrostático e hidrofóbico da interação da TPPS₄ com as vesículas de fosfolipídios em relação á porfirina catiônica, pretendemos realizar titulações da TPPS₄ em função da concentração de POPC puro, DOTAP (fosfolipídio catiônico) puro e com a mistura POPC+DOTAP em diferentes proporções. Estes experimentos serão acompanhados por medidas de fluorescência no estado estacionário e fluorescência resolvida no tempo. Este estudo irá complementar os trabalhos já desenvolvidos em nosso grupo sobre a associação destas porfirinas com os diferentes surfactantes.

E com a técnica de SAXS pretendemos determinar a forma e o tamanho das micelas mistas de CTAC+TX-100 e SDS+TX-100 na ausência e na presença das porfirinas TPPS₄ e TMPyP, respectivamente. Estas curvas de SAXS já foram adquiridas no LNLS e encontram-se em fase de análise.

No projeto de pós-doutorado pretendemos aprofundar o estudo no comportamento da estrutura oligomérica da proteína, através do entendimento dos mecanismos de dissociação, re-associação e desnaturação. Estudos de dissociação e desnaturação serão realizados com variação de temperatura e pH, bem como a presença de agentes desnaturantes. Fenômenos de re-associação serão estudados na presença de íons, monocations e dications. Este estudo poderá contribuir para uma compreensão mais aprofundada a nível molecular das interações entre as subunidades responsáveis pela manutenção da estrutura oligomérica da proteína gigante. Pretendemos ainda estudar a auto-oxidação e oxidação do heme da proteína, bem como a interação da HbGp com surfactantes iônicos e não iônicos. Todos estes fenômenos de dissociação, desnaturação, re-associação, auto-oxidação e oxidação serão estudados em conjunto, pois estão todos diretamente relacionados. Para alcançar estes objetivos estamos propondo o uso de diversas técnicas espectroscópicas, em especial a absorção ótica, emissão de fluorescência,

espalhamento de luz dinâmico, dicroísmo circular e calorimetria, assim como algumas técnicas estruturais, como espalhamento de raios X a baixo ângulo e ultracentrifugação analítica. O uso do conjunto de técnicas proposto deverá contribuir para um salto qualitativo importante no conhecimento e caracterização desta hemoglobina gigante que vem sendo estudada no nosso grupo há vários anos.

PARTE V

V.1 Referências bibliográficas

1. WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. L. **Principles of biochemistry**. 4.ed. New York: Academic Press, 1968. 300p.
2. ABRAHAM, R. J.; HAWKES, G. E.; SMITH, K. M. N-H Tautomerism in Porphyrins - NMR-Study. **Tetrahedron Lett.**, v. 16, p. 1483-1486, 1974.
3. BATLLE, A. M.; DEL C. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy – a model for carcinogenesis luminescence. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 20, n. 1, p. 5-22, 1993.
4. VAN ESCH, J. H.; FEITERS, M. C.; PETERS, A. M.; NOLTE, R. J. Uv-Vis, fluorescence, and EPR studies of porphyrins in bilayers of dioctadecyldimethylammonium surfactants. **J. Phys. Chem.**, v. 98, n. 21, p. 5541-5551, 1994.
5. BONNETT, R. Progress with heterocyclic photosensitizers for the photodynamic therapy (PDT) of tumours. **J. Heterocyclic Chem.**, v. 39, n. 3, p. 455-470, 2002.
6. HAMBRIGHT, P.; FAWWAZ, R.; VALK, P.; MCRAE, J.; BEARDEN, A. Distribution of various water-soluble radioactive metalloporphyrins in tumor bearing mice. **Bioinorg. Chem.**, v. 5, n. 1, p. 87-92, 1975.
7. MAITI, N. C.; MAZUNDAR, S.; PERIASAMY, N. Dynamics of Porphyrin Molecules in Micelles - Picosecond Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Studies. **J. Phys. Chem.**, v. 99, n. 27, p. 10708-10715, 1995.
8. MAITI, N. C.; MAZUMDAR S.; PERIASAMY N. J- and H-aggregates of porphyrin-surfactant complexes: Time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies, **J. Phys. Chem. B**, v. 102, p. 1528-1538, 1998.
9. KANO, K.; FUKUDA, K.; WAKAMI, H.; NISHIYABU, R.; PASTERNAK, R. F. Factors influencing self-aggregation tendencies of cationic porphyrins in aqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 122, p. 7494-7502, 2000.
10. KHAIRUTDINOV, R. F.; SERPONE, N. Laser-induced light attenuation in solutions of porphyrin aggregates. **J. Phys. Chem.**, v. 99, n. 31, p. 11952-11958, 1995.
11. BROW, S. B.; SHILLCOCK, M. Equilibrium and kinetic studies of aggregation of porphyrins in aqueous-solution. **Biochem. J.**, v. 153, n. 2, p. 279-285, 1976.
12. OHNO, O.; KAIZU, Y.; KOBAYASHI, H. J-aggregate formation of a water-soluble porphyrin in acidic aqueous-media. **J. Chem. Phys.**, v. 99, n. 5, p. 4128-4139, 1993.

13. KRASNOVSKY, A. A.; NEVEROV JUNIOR, K. V.; EGOROV, S. YU.; ROEDER, B.; LEVALD, T. Photophysical studies of pheophorbide-a and pheophytin-a phosphorescence and photo-sensitized singlet oxygen luminescence. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 5, n. 2, p. 245-254, 1990.
14. KADISH, K. M.; MAIYA, G. B.; ARAULLO-McADAMS, C. Spectroscopic characterization of meso-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrins, $[\text{TMPyP}]\text{H}_2^{4+}$ and $[(\text{TMPyP})\text{M}]^{4+}$, in aqueous micellar media, where $m = \text{VO}^{2+}$, Cu(II) , and Zn(II) . **J. Phys. Chem.**, v. 95, n. 1, p. 427-431, 1991.
15. KADISH, K. M.; MAIYA, G. B.; ARAULLO, C.; GUILARD, R. Micellar effects on the aggregation of tetraanionic porphyrins - spectroscopic characterization of free-base meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin, (TPPS)H-2, and (TPPS)Zn(II), (TPPS)Cu(II), (TPPS)Vo²⁺ in aqueous micellar media. **Inorg. Chem.**, v. 28, n. 14, p. 2725-2731, 1989.
16. GANDINI, S. C. M.; YUSHMANOV, V. E.; BORISSEVITCH, I. E.; TABAK, M. Interaction of the tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin with ionic surfactants: aggregation and location in micelles. **Langmuir**, v. 15, n. 19, p. 6233-6243, 1999.
17. AGGARWAL, L. P. F. **Interações das porfirinas aquo-solúveis TPPS4 e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos de pH e da força iônica.** 2005. 157 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos.
18. GANDINI, S. C. M.; YUSHMANOV, V. E.; TABAK, M. Interaction of Fe(III)- and Zn(II)-tetra(4-sulfonatophenyl) porphyrins with ionic and nonionic surfactants: aggregation and binding. **J. Inorg. Biochem.**, v. 85, n. 4, p. 263-277, 2001.
19. SANTIAGO, P. S.; GANDINI, S. C. M.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Interaction of cationic water-soluble meso tetrakis (4-N-methylpyridiniumyl) porphyrin (TMPyP) with ionic and nonionic micelles: aggregation and binding. **J. Porphyrin Phyta.**, in press 2008.
20. SANTIAGO, P. S.; GANDINI, S. C. M.; TABAK, M. Spectroscopic studies of the interaction of cationic water-soluble iron(III) meso-tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrin (FeTMPyP) with ionic and nonionic micelles. **J. Porph. Phythal.**, v. 9, p. 94-108, 2005.
21. BARBER, D. C.; FREITAG-BEESTON, R. A.; WHITTEN, D. G. Atropisomer-specific formation of premicellar porphyrin j-aggregates in aqueous surfactant solutions. **J. Phys. Chem.**, v. 95, p. 4074-4086, 1991.
22. BORISSEVITCH, I. E.; GANDINI, S. C. M. Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin bound to DNA. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 43, n. 2, p. 112-120, 1998.
23. GANDINI, S. C. M.; BORISSEVITCH, I. E.; PERUSSI, J. R.; IMASATO, H.; TABAK, M. Aggregation of meso-tetrakis(4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin in its free base, Fe(III) and Mn(III) forms due to the interaction with DNA in aqueous solutions: Optical absorption, fluorescence and light scattering studies. **J. Luminescence**, v. 78, n. 1, p. 53-61, 1998.

- 24 GANDINI, S. C. M.; YUSHMANOV, V. E.; PERUSSI, J. R.; GANDINI, S. C. M.; YUSHMANOV, V. E.; BORISSEVITCH, I. E. Binding of the Mn(III) complex of meso-tetrakis(4-N-methyl-pyridiniumyl)porphyrin to DNA effect of ionic strength. **J. Inorg. Biochem.**, v. 73, n. 1-2, p. 35-40, 1999.
25. PASTERNAK, R. F.; GIBBS, E. J.; VILAFRANCA, J. Interactions of porphyrins with nucleic-acids. **Biochemistry**, v. 22, n. 23, p. 5409-5417, 1983.
26. YUSHMANOV, V. E.; IMASATO, H.; TOMINAGA, T. T.; TABAK, M. H-1 NMR and electronic absorption spectroscopy of paramagnetic water-soluble meso-tetraarylsubstituted cationic and anionic metalloporphyrins. **J. Inorg. Biochem.**, v. 61, n. 4, p. 233-250, 1996.
27. BORISSEVITCH, I. E.; TOMINAGA, T.T.; IMASATO, H.; TABAK, M. Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin. **Anal. Chim. Acta**, v. 343, n. 3, p. 281- 286, 1997.
28. MAZUMDAR, S.; MEDHI, O. K.; MITRA, S. 6-coordinated high-spin models for ferric hemoproteins - nmr and electron-spin-resonance study of the diaquo(protoporphyrinato-IX) iron(III) cation and aquohydroxo(protoporphyrinato IX) iron(III) intercalated in aqueous detergent micelles. **Inorg. Chem.**, v. 27, p. 2541-2543, 1988.
29. GROVES, J. T.; NEUMANN, R. Regioselective oxidation catalysis in synthetic phospholipid-vesicles - membrane-spanning steroidal metalloporphyrins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111, p. 2900-2909, 1989.
30. VAN ESCH, J. H.; ROKS, M. F. M.; NOLTE, R. J. M. Membrane-bound cytochrome-p-450 mimic - polymerized vesicles as microreactors. **J. Am. Chem.**, v. 108, p. 6093-6094, 1986.
31. RICCHELLI, F.; GOBBO, S.; JORI, G.; MORENO, G; VINZENS, F.; SALET, C. Photosensitization of mitochondria by liposome-bound porphyrins. **Photochem. Photobiol.**, v. 58, p. 53-58, 1993.
32. RICCHELLI, F; JORI, G. Distribution of porphyrins in the various compartments of unilamellar liposomes of dipalmitoyl-phosphatidylcholine as probed by fluorescence spectroscopy. **Photochem. Photobiol.**, v. 44, p. 151-157, 1986.
33. MAITI, N. C.; MAZUMDAR, S.; PERIASAMY, N. J- and H-aggregates of porphyrin-surfactant complexes: Time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies. **J. Phys. Chem. B**, v. 102, n. 9, p. 1528-1538, 1998.
34. MAZUMDAR, S. H-1 and C-13 RMN-studies on the structure of micelles encapsulating hemes in aqueous sodium dodecyl-sulfate solutions. **J. Phys. Chem.**, v. 94, n. 15, p. 5947-5953, 1990.
35. MAITI, N. C.; MAZUNDAR, S.; PERIASAMY, N. Controlled J-aggregation of porphyrins by cationic surfactants. **Curr. Sci.**, v. 70, n. 11, p. 997-999, 1996.

36. TOMINAGA, T.; ENDOH, S.; ISHIMARU, H. Interactions between an anionic porphyrin and cationic surfactants in water. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 64, n. 3, p. 942-948, 1991.
37. BARBER, D. C.; FREITAG-BEESTON, R. A.; WHITTEN, D. G. Atropisomer-specific formation of premicellar porphyrin j-aggregates in aqueous surfactant solutions. **J. Phys. Chem.**, v. 95, n. 10, p. 4074-4086, 1991.
38. SCOLARO, L. M.; DONATO, C.; CASTRICIANO, M.; ROMEO, A.; ROMEO, R. Micellar aggregates of platinum(II) complexes containing porphyrins. **Inorg. Chim. Acta**, v. 300, p. 978-986, 2000.
39. RICCHELLI, F.; JORI, G.; MORENO, G.; VINZENS, F.; SALET, C. Factors influencing the distribution pattern of porphyrins in cell-membranes. **J. Photochem. Photobiol B**, v. 6, n. 1-2, p. 69-77, 1990.
40. LI, X. W.; ZHENG, Z. L.; HAN, M. Y.; CHEN, Z. P.; ZOU, G. L. Tuning J-aggregates of tetra(p-hydroxyphenyl)porphyrin by the headgroups of ionic surfactants in acidic nonionic micellar solution. **J. Phys. Chem B**, v. 111, n. 17, p. 4342-4348, 2007.
41. SINGER, S. L.; NICOLSON, G. L. Fluid mosaic model of structure of cell-membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.
42. SINGER, S. L.; MARCHESI, V.T.; NICOLSON, G. L. The localization of spectrin on the inner surface of human red blood cell membranes by ferritin-conjugated antibodies. **J. Cell Biol.**, v. 51, p. 265-272, 1971.
43. THOMAS, H. G.; LOMAKIN, A.; BLANKSCHTEIN, D.; BENEDEK, G. B. Growth of mixed nonionic micelles. **Langmuir**, v. 13, p. 209-218, 1997.
44. TANFORD, C. **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**. New York: Wiley, 1973. 233p.
45. GARAMUS, V. M. Study of mixed micelles with varying temperature by small-angle neutron scattering. **Langmuir**, v. 13, p. 6388-6392, 1997.
46. GAO, H.C.; ZHAO, S.; MAO, S.Z.; YUAN, H.Z.; YU, J.Y.; SHEN, L.F.; DU, Y.R. Mixed micelles of polyethylene glycol (23) lauryl ether with ionic surfactants studied by proton 1D and 2D NMR **J. Coll. Interf. Sci.**, v. 249, p. 200-208, 2002.
47. YUAN, H. Z.; ZHAO, S.; CHENG, G. Z.; ZHANG, L.; MIAO, X. J.; MAO, S. Z.; YU, J. Y.; SHEN, L. F.; DU, Y. R. Mixed micelles of triton X-100 and cetyl trimethylammonium bromide in aqueous solution studied by H-1 NMR. **J. Phys. Chem. B**, v. 105, p. 4611-4615, 2001.
48. NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 301.
49. GENNIS, R. B. **Biomembranes: molecular structure and functions**. New York: Springer Verlag, 1989. p. 533.

50. KALYANASUNDARAM, K. **Photochemistry in microheterogeneous systems**. New York: Academic Press, 1983. p. 626.
51. THE MERCK Index. 12.ed. Whitehouse Station: Merck, 1996. 1v.
52. BOMAN, N. L.; MAYER, L. D.; CULLIS, P. R. Optimization of the retention properties of vincristine in liposomal systems. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1152, n. 2, p. 253-258, 1993.
53. MARIANI, P.; CARSUGHI, F.; SPINOZZI, F.; ROMANZETTI, S.; MEIER, G.; CASADIO, R.; BERGAMINI, C. Ligand-induced conformational changes in tissue transglutaminase: Monte Carlo analysis of small-angle scattering data. **Biophys. J.**, v. 78, p. 3240- 3251, 2000.
54. CASTELLETTO, V.; ITRI, R.; AMARAL, L. Q.; SPADA, G. P. Small-angle x-ray-scattering of DNA fragments - form and interference factors. **Macromolecules**, v. 28, p. 8395-8400, 1995.
55. GABORIAUD, F.; NONAT, A.; CHAUMONT, D.; CRAIEVICH, A. Aggregation and gel formation in basic silico-calco-alkaline solutions studied: A SAXS, SANS, and ELS study. **J. Phys. Chem. B**, v. 103, p. 5775-5781, 1999.
56. AMARAL, C. L. C.; ITRI, R.; POLITI, M. J. Structure determination of AOT/n hexane/water/urea reversed micelles by light and small angle x-ray scattering. **Langmuir**, v. 12, n. 20, p. 4638-4643, 1996.
57. CAETANO, W.; GELAMO, E. L.; ITRI, R.; TABAK, M. Chlorpromazine and sodium dodecyl sulfate mixed micelles investigated by small angle X-ray scattering. **J. Coll. Interf. Sci**, v. 248, p. 149-157, 2002.
58. SCHADLER, V.; LINDNER, P.; WIESNER, U.; MENDES, E. Ionic and zwitterionic model macromolecular surfactants. **J. Phys. Chem. B**, v. 102, p. 7316-7318, 1998.
59. GLATTER O.; KRATKY, O. **Small angle x-ray scattering**. London: Academic Press, 1982. p. 515.
60. GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small angle scattering of x-rays**. New York: Wiley, 1955. p. 268.
61. POROD, G. X-ray and light scattering by chain molecules in solution. **J. Polym. Sci.**, v.10, n. 2, p. 157-166, 1953
62. ITRI, R.; AMARAL, L. Q. Distance distribution function of sodium dodecyl-sulfate micelles by x-ray-scattering **J. Phys. Chem.**, v. 95, p. 423-427, 1991.
63. GLATTER, O. Interpretation of real-space information from small-angle scattering experiments. **J. App. Cryst.**, v. 12, p. 166-175, 1979.
64. MARIGNAN, J.; BASSERAU, P.; DELORD, P. Effect of pentanol and concentration on the micelles in the system obs/water/1-pentanol. **J. Phys. Chem.**, v. 90, p. 645-652, 1986.

65. ITRI, R.; AMARAL, L. Q. Micellar-shape anisometry near isotropic liquid-crystal phase-transitions. **Phys. Rev. E.**, v. 47, p. 2551-2557, 1993.
66. CAETANO, W.; BARBOSA, L. R. S.; ITRI, R.; TABAK, M. Trifluoperazine effects on anionic and zwitterionic micelles: a study by small angle X-ray scattering. **J. Coll. Interf. Sci.**, v.260, p. 414-422, 2003.
67. HAYTER, J. B.; PENFOLD, J. An analytic structure factor for macroion solutions. **Mol. Phys.**, v. 42, p. 109-118, 1981.
68. HANSEN, J. P.; HAYTER, J. B. A rescaled MSA structure factor for dilute charged colloidal dispersions. **Mol. Phys.**, v. 46, p. 651, 1982.
69. SKOOG, D.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. Philadelphia: Saunders, 1992. 700p.
70. LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Kluwer Academic, 1999. 698p.
71. HAMBRIGHT P. Chemistry of the water-soluble porphyrins. In: KADISH, K. M., SMITH, K. M. and GUILARD R. (Eds.). The Porphyrin handbook. San Diego: Academic Press, 2000. v. 3, p. 129-210.
72. PASTERNAK, R.F.; COLLINS, P.J. Resonance light-scattering - a new technique for studying chromophore aggregation. **Science**, v. 269, n. 5226, p. 935-939, 1995.
73. PASTERNAK, R. F; GURRIERI, S.; LAUCERI, R.; PURRELLO, R. Single-stranded nucleic acids as templates for porphyrin assembly formation. **Inorg. Chim. Acta**, v. 246, n. 1-2, p. 7-12, 1996.
74. BORISSEVITCH, I. E.; TOMINAGA, T.T.; IMASATO, H.; TABAK, M. Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin. **Anal. Chim. Acta**, v. 343, n. 3, p. 281-286, 1997.
75. GANDINI, S. C. M.; GELAMO, E. L.; ITRI, R.; TABAK M. Aggregation in water solutions of tetrasodium diprotonated meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin. **Biophys. J.**, v. 85, p. 1259-1268, 2003.
76. JANSSON, J.; SCHILLEN, K.; NILSSON, M.; SÖDERMAN, O.; FRITZ, G.; BERGMANN, A.; GLATTER, O. Small-angle X-ray scattering, light scattering, and NMR study of PEO-PPO-PEO triblock copolymer/cationic surfactant complexes in aqueous solution. **J. Phys. Chem. B**, v. 109, p. 7073-7083, 2005.
77. ASWAL, V. K.; GOYAL, P. S. Counterions in the growth of ionic micelles in aqueous electrolyte solutions: A small-angle neutron scattering study. **Phy. Rev.**, v. 61, n. 3, p. 2947-2953, 2000.

78. LIU, Y. C.; CHEN S. H.; ITRI R.; Ion correlations and counter-ion condensation in ionic micellar solutions. **J. Phys. A: Condensed Matter**, v. 8, p. 169, 1996.
79. GANDINI, S. C. M.; ITRI R.; SOUSA NETO D.; TABAK, M. Porphyrin effects on zwitterionic HPS micelles as investigated by small-angle X-ray scattering (SAXS) and electron paramagnetic resonance (EPR). **J. Phys. Chem. B**, v. 109, p. 22264-22272, 2005.
80. BARBOSA, L. R. S.; CAETANO, W.; ITRI R.; HOMEM-DE-MELLO, P.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Interaction of phenothiazine compounds with zwitterionic lysophosphatidylcholine micelles: small angle x-ray scattering, electronic absorption spectroscopy, and theoretical calculations. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, p. 13086, 2006.
81. COPPOLA, L.; GIANFERRI, R.; NICOTERA, I.; OLIVIERO, C.; RANIERI, G. A. Structural changes in CTAB/H₂O mixtures using a rheological approach. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 6, n. 9, p. 2364-2372, 2004.
82. ASWAL, V. K.; GOYAL, P. S. Dependence of the size of micelles on the salt effect in ionic micellar solutions. **Chem. Phys. Lett.**, v. 364, p. 44-50, 2002.
83. BUDIL, D. E.; LEE, S.; SAXENA, S.; FREED, J. S. J. Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm. **Magnetic Reson. A**, v. 120, n.2, p. 155-189, 1996.
84. SANTIAGO, P. S.; SOUZA NETO, D.; BARBOSA, L. R. S.; ITRI, R.; TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin with cationic CTAC micelles investigated by Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) and Electron Paramagnetic Resonance (EPR). **J. Coll. Interf. Sci.**, v. 316, p. 730-740, 2007.
85. R. ROTOMSKIS, R. AUGULIS, V. SNITKA, R. VALIOKAS, B. LIEDBERG Hierarchical Structure of TPPS4 J-Aggregates on Substrate Revealed by Atomic Force Microscopy. **J. Phys. Chem. B**, v. 108, p. 2833-2838, 2004.
86. PASTERNAK, R. F.; CENTURO, G. C.; BOYD, P.; HINDS, L. D.; HUBER, P. R.; FRANCESCONI, L.; FASELLA, P.; ENGASSER, G.; GIBBS, E. On the aggregation of Meso-Substituted water-Soluble Porphyrins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 94, p. 4511-4517, 1972.
87. PAOLI, V. M.; PAOLI, S. H.; BORISSEVITCH, I. E.; TEDESCO, A. C. Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH₂ associated with micelles and DNA. **J. Alloys Compd.**, v. 344, p. 27-31, 2002.
88. PAULO, P. M. R.; COSTA, S. M. B. Interactions in noncovalent PAMAM/TMPyP systems studied by fluorescence spectroscopy. **J. Phys. Chem. B**, v. 109, p. 13928-13940, 2005.
89. LAVI, A.; WEITMAN, H.; HOLMES, R. T.; SMITH, K. M.; EHRENBERG, B. The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency. **Biophysical J.**, v. 82, p. 2101-2110, 2002.

90. BRONSHTEIN, I.; AFRI, M.; WEITMAN, H.; FRIMER, A. A.; K. SMITH, M.; EHRENBERG, B. Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency. **Biophysical J.**, v. 82, p. 1155, 2004.
91. PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, G. D. Analysis of the circular-dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm - a practical guide. **Anal. Biochem.**, v. 203, n. 1, p. 83-93, 1992.
92. SHARMA, R.; VARADE, D.; BAHADUR, P. Mixed micelles of Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate and their interaction with polymers. **J. Disp. Sci. Tech.**, v. 24, p. 53-61, 2003.
93. SHILOACH, A.; BLANKSCHTEIN, D. Measurement and prediction of ionic/nonionic mixed micelle formation and growth. **Langmuir**, v. 14, p. 7166-7182, 1998.
94. ZHONG-XIU C.; SHAO-PING D.; XIAO-KUI L. Micellization and synergistic interaction of binary surfactant mixtures based on sodium nonylphenol polyoxyethylene ether sulfate. **J. Colloid Interface. Sci.**, v. 318, p. 389-396, 2008.
95. JANCZUK, B.; BRUQUE, J. M.; GONZALEZMARTIN, M. L.; DORADOCALASANZ, C. The properties of mixtures of ionic and nonionic surfactants in water at the water/air interface **Colloids Surf. A**, v.104, n. 2-3, p.157-163, 1995.
96. CHARLTON, I. D.; DOHERTY, A. P. Electrolyte-induced structural evolution of Triton X-100 micelles. **J. Phys. Chem. B**, v. 104, p. 8327-8332, 2000.
97. SHARMA, K. S.; PATIL, S. R.; RAKSHIT, A. K.; GLENN, K.; DOIRON, M.; PALEPU, R. M. HASSAN, P. A. Self-Aggregation of a Cationic-Nonionic Surfactant Mixture in Aqueous Media: Tensiometric, Conductometric, Density, Light Scattering, Potentiometric, and Fluorometric Studies. **J. Phys. Chem. B**, v. 108, p. 12804-12812, 2004.
98. NASSAR, P. M.; ALMEIDA, L. E.; TABAK, M. Binding of dipyrindamole to phospholipid vesicles: a fluorescence study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1328, p. 140-150, 1997.
99. CHABASSE, C.; BAILLY, X.; SANCHEZ, S.; ROUSSELOT, M.; ZAL, F. Gene structure and molecular phylogeny of the linker chains from the giant annelid hexagonal bilayer hemoglobins. **J. Mol. Evol.**, v. 63, n. 3, p. 365-374, 2006.
100. 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*. **J. Mol. Biol.**, v. 289, n.5, p. 1361-1374, 1998.
101. KREBS, A.; ZIPPER, P.; VINOGRADOV, S. N. Lack of size and shape alteration of oxygenated and deoxygenated *Lumbricus terrestris* hemoglobin? **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1297, p. 115-118, 1996.
102. VINOGRADOV, S. N. The stoichiometry of the four linker subunits of *Lumbricus terrestris*. **Micron**, v. 35, p. 127-129, 2004.

103. COSTA, M. C. P.; BONAFÉ, C. F. S.; MEIRELLES, N. C.; GALEMBECK, F. Sedimentation coefficient and minimum molecular-weight of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex-paulistus* (oligochaeta). **Braz. J. Med. Res.**, v. 21, p. 115-118, 1988.
104. ROYER, W. E.; KNAPP, J. E.; STRAND, K.; HEASLET, H. A. Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. **Trends Biochem. Sci.**, v. 26, n. 5, p. 297-304, 2001.
105. ROYER, W. E.; SHARMA, H.; STRAND, K.; KNAPP, J. E.; BHYRAVBHATLA, B. Lumbricus Erythrocrurin at 3.5 angstrom resolution: architecture of a megadalton respiratory complex. **Structure**, v. 14, p. 1167-1177, 2006.
106. ROYER JR., W. E.; STRAND, K.; VAN HEEL, M.; HENDRICKSON, W. A. Structural Hierarchy in erythrocrurin, the giant respiratory assemblage of annelids. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 7107-7111, 2000.
107. MEIRELLES, N. C.; OLIVEIRA, B.; OLIVEIRA, A. R.; DE PAULA, E.; MARANGONI, S.; RENNEBECK, G. M. Erythrocrurin of glossoscolex-paulistus (oligochaeta, glossoscolecidae) - dissociation at alkaline ph and its ligand properties as revealed by chemical, immunochemical and electron-microscopy studies. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 88, n. 2, p. 377-379, 1987.
108. OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Partial characterization of giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: A MALDI-TOF-MS study. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 40, p. 429-436, 2007.
109. 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 equilibria, non-globin linker chains, and valence of the heme iron. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 30007-30021, 1996.
110. FUSHITANI, K.; RIGGS, A. F. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris* - oxygenation properties of isolated chains, trimer, and a reassociated product. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 10275-10281, 1991.
111. ROUSSELOT, M.; DELPY, E.; LA ROCHELLE, C. D.; LAGENTE, V.; PIROW, R.; REES, J.; HAGEGE, A.; LE GUEN, D.; HOURDEZ, S.; ZAL, F. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. **Biotechnol. J.**, v. 1, p. 333-345, 2006.
112. OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Interaction of giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) with ionic surfactants: A MALDI-TOF-MS study. **Intern. J. Biol. Macrom.**, v.42, n.2, p.111-119, 2008.
113. 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. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118A, p. 171-181, 1998.

114. 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*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1298, p. 148-158, 1996.
115. IMASATO, H.; TINTO, M. H.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* obtained by gel filtration. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 112B, p. 217-226, 1995.
116. GELAMO, E. L.; ITRI, R.; TABAK, M. Small Angle X-ray Scattering (SAXS) Study of the Extracellular Hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. Effect of pH, Iron Oxidation State, and Interaction with Anionic SDS Surfactant. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 33298-33305, 2004.
117. SANTIAGO, P. S.; MOREIRA, L. M.; DE ALMEIDA, E. V.; TABAK, M. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* Hemoglobin (HbGp) upon interaction with cethyltrimethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants: Dissociation of oligomeric structure and autoxidation. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1770, p. 506-517, 2007.
118. MOREIRA, L. M.; SANTIAGO, P. S.; DE ALMEIDA, E. V.; TABAK, M. Interaction of giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) with zwitterionic surfactant *N*-hexadecyl-*N,N*-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS): Effects of oligomeric dissociation. **Coll. Surf. B**, v. 61, p. 153-163, 2008.
119. 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. **Coll. Surf. B**, v. 52, p. 96-104, 2006.
120. 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*. **Biophys. J.**, v. 94, p. 2228-2240, 2008.
121. ROUSSELOT, M.; LE GUEN, C.; CHABASSE, F.; ZAL. Native and subunit molecular mass and quaternary structure of the hemoglobin from the primitive *Branchiopod crustacean triops cancriformis*. **FEBS J.**, v. 273, p. 1582-1596, 2006.
122. PETTA, V.; MORADIAN-OLDAK, J.; YANNOPOULOS, S. N.; BOUROPOULOS, N. Dynamic light scattering study of an amelogenin gel-like matrix in vitro. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 114, p. 308-314, 2006.
123. 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 Biochem.**, v. 351, p. 100-113, 2006.

124. SHARMA, P. K.; KUCHUMOV, A. R.; CHOTTARD, G.; MARTIN, P. D.; WALL, J. S.; VINOGRADOV, S. N. The role of the dodecamer subunit in the dissociation and reassembly of the hexagonal bilayer structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 15, p. 8754-8762, 1996.
125. RIGGS, A. F. Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1073-1084, 1998.
126. 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. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 31, p. 18695-18704, 1996.
127. CABRAL, C. B.; IMASATO, H.; ROSA, J. C.; LAURE, H. J.; SILVA, C. H. T. P.; TABAK, M.; GARRAT, R. C.; GREENE, L. J.; Fluorescence properties of tryptophan residues in the monomeric d-chain of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin: an interpretation based on a comparative molecular model. **Biophys. Chem.**, v. 97, p. 139-157, 2002.
128. KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1338, p. 161-185, 1997.
129. SCHMITZ, K. S. **An introduction to dynamic light scattering by macromolecules**. Boston: Academic Press, 1990. p. 449.
130. SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of *Tobacco mosaic virus*. **Biophys. J.**, v. 71, p. 1641-1650, 1996.
131. PECORA, R. **Dynamic light scattering**. New York: Plenum Press, 1985. p. 420.
132. HIRSCH, R. E.; VIDUGIRIS, G. J. A.; FRIEDMAN, J. M.; HARRINGTON, J. P. Alteration of tryptophan fluorescence properties upon dissociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1205, p. 248-251, 1994.
133. FUSHITANI, K.; HIGASHIYAMA, K.; ASAO, M.; HOSOKAWA, K. Characterization of the constituent polypeptides of the extracellular hemoglobin from *Lumbricus terrestris*: heterogeneity and discovery of a new linker chain L4. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1292, p. 273-280, 1996.
134. AJLOO, D.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; HAKIMELAHI, G. H.; SABOURY, A. A.; GHARIBI, H. The effect of dodecyl trimethylammonium bromide on the formation of methemoglobins and hemichrome. **Colloids Surf. B**, v. 26, p. 185-196, 2002.
135. OTZEN, D. E. Protein Unfolding in Detergents: Effect of Micelle Structure, Ionic Strength, pH, and Temperature. **Biophys. J.**, v. 83, p. 2219-2230, 2002.
136. OTZEN, D. E.; OLIVERBERG, M. Burst-phase expansion of native protein prior to global unfolding in SDS. **J. Mol. Biol.**, v. 315, p. 1231-1240, 2002.

137. 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. **Anal. Biochem.**, v. 259, p. 195-202, 1998.
138. KREBS, A.; LAMY, J.; VINOGRADOV, S. N.; ZIPPER, P. *Lumbricus terrestris* hemoglobin: a comparison of Small Angle X-Ray Scattering and Cryoelectron Microscopy data. **Biopolymers**, v. 45, p.289-298, 1998.
139. 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. **Biophys. Chem.**, v. 114, p. 253-260, 2005.
140. BENJWAL, S.; JAYARAMAN, S.; GURSKY, O. Electrostatic effects on the stability of discoidal high-density lipoproteins. **Biochemistry**, v. 44, p. 10218-10226, 2005.
141. BONAFE, C. F. S.; VILLAS-BOAS, M.; SUAREZ, M. C.; SILVA, J. L. Reassembly of a large multisubunit protein promoted by nonprotein factors - effects of calcium and glycerol on the association of extracellular hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 13210-13216, 1991.
142. CIONI, P.; STRAMBINI, G. B. Pressure-induced dissociation of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: heterogeneous kinetics and perturbations of subunit structure. **Biochemistry**, v. 36, p. 8586-8593, 1997.

Súmula curricular

Patrícia Soares Santiago
Instituto de Química de São Carlos/USP
Av. Trabalhador São-carlense, 400
São Carlos/SP
Tel: 16-33739960
Email: iqsantiago@gmail.com

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- 1) SANTIAGO, P. S.; GANDINI, S. C. M.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Interaction of cationic water-soluble meso tetrakis (4-N-methylpyridiniumyl) porphyrin (TMPyP) with ionic and nonionic micelles: aggregation and binding. **J. Porphyrin Phyta.**, submetido 2008.
- 2) SANTIAGO, P. S.; SOUZA NETO, D.; GANDINI, S. C. M.; TABAK, M. On the localization of water-soluble porphyrins in micellar systems evaluated by static and time-resolved frequency-domain fluorescence techniques. **Colloids Surf., B** , aceito 2008.
- 3) 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*. **Biophys. J.**, v. 94, p. 228-2240, 2008.
- 4) MOREIRA, L. M.; SANTIAGO, P. S.; DE ALMEIDA, E. V.; TABAK, M. Interaction of giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) with zwitterionic surfactant *N*-hexadecyl-*N,N*-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS): Effects of oligomeric dissociation. **Colloids Surf., B** v. 61, p. 153–163, 2008.

- 5) DOMINGUES, M. M.; SANTIAGO, P. S.; CASTANHO, M. A. R. B. ; SANTOS, N. C. What can light scattering spectroscopy do for membrane-active peptide studies? **J. Pept. Sci.**, v. 14, p. 394-400, 2008.
- 6) SANTIAGO, P. S.; SOUZA NETO, D.; BARBOSA, L. R. S.; ITRI, R.; TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin with cationic CTAC micelles investigated by Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) and Electron Paramagnetic Resonance (EPR). **J. Colloid Interface. Sci.**, v. 316, p. 730–740, 2007.
- 7) SANTIAGO, P. S., MOREIRA, L. M.; DE ALMEIDA, E. V.; TABAK, M. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* Hemoglobin (HbGp) upon interaction with cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants: Dissociation of oligomeric structure and autoxidation. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1770, p. 506-517, 2007.
- 8) BARBOSA, L. R. S.; CAETANO, W.; ITRI R.; HOMEM-DE-MELLO, P.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Interaction of phenothiazine compounds with zwitterionic lysophosphatidylcholine micelles: small angle x-ray scattering, electronic absorption spectroscopy, and theoretical calculations. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, p. 13086, 2006.
- 9) SANTIAGO, P. S., MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Phosphate group effects upon the equilibrium of iron(III) meso-tetrakis (4-N-methylpyridiniumyl) porphyrin in aqueous solution. **J. Inorg. Biochem.**, v.100, p. 1715–172, 2006.
- 10) SANTIAGO, P. S.; GANDINI, S. C. M.; TABAK, M. Spectroscopic studies of the interaction of cationic water-soluble iron(III) meso-tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrin (FeTMPyP) with ionic and nonionic micelles, **J. Porph. Phthal**, v. 9 p. 94-108, 2005.