ANA ELIZA BARBOSA BARROS

Estudos espectroscópicos da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) modificada pela sonda Fluoresceína isotiocianato e caracterização da apo-HbGp na ausência e presença da sonda 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS).

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências.

Área de concentração: Físico-química

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

Coorientador: Prof.Dr. Francisco Adriano de O. Carvalho

São Carlos-SP

2019

“Se alguém de vós necessita de sabedoria, peça-a Deus que a todos dá liberalmente com simplicidade e sem recriminação e ser-lhe-á dada.”

Tiago, 1,5

Ao meu noivo Henrique de Oliveira;
À minha Família;

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre providenciado tudo na minha vida ;

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcel Tabak por sua orientação segura, por me conceder a oportunidade de realizar esse trabalho e pela amizade construída ao longo desses sete anos de convivência. Sem ele nada disso seria possível;

À minha mãe Josefa e ao meu pai João pelo amor sem medida e apoio constante durante toda essa caminhada rumo a esse título;

Ao meu noivo Henrique o amor da minha vida, pelo carinho e companheirismo, por sua compreensão nos momentos em que eu estive ausente e por toda a força indispensável para que eu chegasse até aqui;

Aos meus irmãos e irmãs, cunhado (a)s, sobrinho(a)s por sempre estarem me encorajando na busca dos meus sonhos e por acreditarem no meu potencial. Obrigada em especial a minha irmã Andreia e ao meu cunhado Thallysson Arnaldo.

As amigas do laboratório de Biofísica molecular Dr^a Célia Sulzbacher Caruso, Dr^a. Fernanda Rosa Alves, Dr^a. Sílvia Helena Libardi pelas discussões valiosas que contribuíram imensamente com este trabalho, e singularmente a Célia por se dispor a vir me buscar no laboratório nos horários caóticos nas incontáveis vezes que precisei, pela ajuda na preparação das proteínas e pela ótima amizade durante todos esses anos;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Francisco Adriano de Oliveira Carvalho (Unifesspa) por ter me acompanhado nos experimentos de ultracentrifugação analítica (AUC) na UnB e pelos debates significativos que contribuíram muito com este trabalho;

Ao Prof. Dr Amando Siuti Ito (USP) por ter colaborado nas discussões dos resultados que foram imprescindíveis para a elaboração da primeira parte do capítulo 4 dessa tese, juntamente com a Dra. Marina Berardi, além da disposição e assistência no manuseio do equipamento de fluorescência resolvida no tempo.

À Prof^a. Dr^a. Izabela Marques Dourado Bastos por disponibilizar a ultracentrífuga analítica do seu Laboratório Interação Patógeno-hospedeiro na UnB, pela acolhida e por ter viabilizado nossa estadia em Brasília.

À técnica Dr^a. Andressa Patrícia Alves Pinto do Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do IFSC-USP pela disposição em auxiliar e por ceder equipamentos e reagentes para a determinação do coeficiente de extinção molar da apo-HbGp;

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Canduri por ter me consentido como bolsista PAE e pela cordialidade;

À Prof^a. Dr^a. Janete Soares de Gamboa (UnB), Prof^a. Dr^a. Adriane Damasceno (UNIFESSPA), Prof^a. Dr^a. Patrícia Soares Santiago (UNESP), Prof^a. Dr^a. Sumária Sousa (UNEMAT) e ao Prof. Dr. José Wilson Pires Carvalho (UNEMAT) pela afeição;

Aos Amigo(a)s Aline, Régis, Carlos, Leonardo, Wilner, Aldinéia, Anderson Arandas, Noeli, Laudimir, Marcela Torricilas, Marcella Paganelli, Vanessa, Jorginho, Eunice, Estefani Kelly, Mariza, Pe. Ranilson pela boa convivência e incentivos realizados;

A todos os funcionários do Instituto de Química de São Paulo/USP de uma maneira especial Veroneide, Gislei, Vanessa, Alessandra Poli, Andreia, Cláudia e Daniele pela atenção e disponibilidade.

À CAPES pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida.

RESUMO

A hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) tem uma massa molecular de 3,6 MDa, determinada por ultracentrifugação analítica. Esta proteína possui uma estrutura oligomérica composta por 144 cadeias globínicas e 36 cadeias sem o grupo heme, denominadas linkers. A HbGp é caracterizada por apresentar uma alta resistência a auto-oxidação e uma alta estabilidade oligomérica quando submetida a condições de estresse, tais como, variações de temperatura, de pH e adição de agentes químicos (ureia, GuHCl e surfactantes). A primeira parte dos resultados desse trabalho descreve a estabilidade oligomérica da oxi-HbGp na presença de ureia, em pH 7,0 monitorada pela sonda de fluorescência fluoresceína isotiocianato (FITC). Este estudo foi desenvolvido através utilizando várias técnicas espectroscópicas, tais como: absorção óptica no UV-Vis, emissão de fluorescência estática e resolvida no tempo, anisotropia de Fluorescência estática e decaimento de anisotropia. Os tempos de vida de emissão de fluorescência dos triptofanos e da sonda FITC foram obtidos. Os decaimentos dos triptofanos são multiexponenciais com quatro tempos de vida, onde dois estão na faixa de picossegundos e dois na faixa de nanossegundos. Os decaimentos de emissão dos triptofanos da oxi-HbGp pura e da oxi-HbGp modificada com FITC são bastante similares. Na ausência do desnaturante na presença de até $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ureia os tempos curtos são predominantes. Em $3,5$ e $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ureia as contribuições dos tempos longos aumentam significativamente. O processo de desenovelamento da oxi-HbGp induzido pela ureia é caracterizado pela dissociação oligomérica da proteína e desnaturação das subunidades dissociadas. Os decaimentos de emissão da sonda para o sistema HbGp-FITC são também multiexponenciais com três tempos de vida, onde um dos tempos, na faixa de nanossegundos, é semelhante ao da sonda livre em tampão de 3,9 ns. Com o aumento da concentração de ureia, as contribuições dos tempos longos aumentam implicando a remoção da supressão observada para a emissão da sonda no sistema HbGp-FITC. Por outro lado, os decaimentos de anisotropia são caracterizados por dois tempos de correlação rotacional, associados ao movimento residual da sonda em relação à proteína. Na segunda parte desse trabalho a forma apo-HbGp, ou seja, a oxi-HbGp sem os grupos hemes foi estudada através de um conjunto de técnicas: eletroforese, ultracentrifugação analítica (AUC), espalhamento dinâmico de luz (DLS), absorção óptica no UV-Vis, dicroísmo circular (CD), fluorescência estática e resolvida no tempo, na ausência e na presença da sonda 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (1,8-ANS). Além disso, a concentração

da apo-HbGp foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA). A partir dessa concentração o coeficiente de extinção molar foi calculado utilizando a lei de Beer-Lambert. Os dados de AUC mostraram duas espécies em solução, correspondendo ao monômero **d** e ao trímero **abc**, com coeficientes de sedimentação em torno de 2,0 e 3,5 S, respectivamente. Pelos dados de DLS percebe-se que a forma apo-HbGp monitorada por longos períodos de tempo é muito instável quando comparada à oxi-HbGp. No estudo de fluorescência resolvida no tempo da apo-HbGp foi observada a predominância de tempos longos, uma vez que os grupos hemes que promovem a supressão da emissão de fluorescência dos triptofanos foram removidos. Três tempos de vida são observados sendo dois mais longos na faixa de nanossegundos e um na faixa de subnanossegundos.

ABSTRACT

The extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) has a molecular mass of 3.6 MDa, determined by analytical ultracentrifugation. This protein has an oligomeric structure composed by 144 globin chains, and 36 additional chains lacking the heme group, named linkers. This class of proteins has a high resistance to oxidation and high oligomeric stability when subjected to stressful conditions such as temperature variation, pH and addition of chemical agents (urea, GuHCl, and surfactants). The first part of the results of this work describes the oxy-HbGp oligomeric stability, in the presence of urea, at pH 7.0, monitored by fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorescence probe. This study was developed through the use of several spectroscopic techniques, such as, UV-VIS optical absorption, static and time-resolved fluorescence (time-correlated single photon counting TCSPC), static anisotropy and time-resolved anisotropy decay. Fluorescence lifetimes were monitored for both tryptophans and FITC and the corresponding emission decays were obtained. Tryptophan decays are multi-exponential with four characteristic lifetimes: two in the picosecond and two in the nanosecond time ranges. The tryptophan emission decays for pure HbGp and HbGp-FITC systems are quite similar. In the absence of denaturant, and up to 2.5 mol L⁻¹ of urea, the shorter lifetimes predominate in the decay. At 3.5 and 6.0 mol L⁻¹ of urea, the longer lifetimes increase significantly their contribution. Urea-induced unfolding process is characterized by protein oligomeric dissociation and denaturation of dissociated subunits. FITC emission decays for FITC-HbGp system are also multi-exponential with three lifetimes: two in the sub-nanosecond and one in the nanosecond range with a value quite similar to the free probe in buffer of 3.9 ns. Increase of urea concentration leads to increase of the longer lifetime contribution, implying the removal of the quenching of the probe emission observed for the native HbGp-FITC system. On the other hand, anisotropy decays are characterized by two rotational correlation times associated to the bound probe, and are due to some residual motion of the probe relative to the protein. In the second part of this work the apo-HbGp (oxy-HbGp without heme groups) was studied through a set of techniques: Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), Analytical Ultracentrifugation (AUC), Dynamic Light Scattering (DLS), UV-VIS optical absorption, Circular Dichroism (CD), static and time-resolved fluorescence, in the absence and in the presence of 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) probe. Moreover, the apo-HbGp concentration was

determined by Bicinchoninic Acid (BCA) method. Based on these protein concentration results, it was possible to determine spectrophotometrically the apo-HbGp molar extinction coefficient employing the Lambert-Beer law. AUC results showed two species in solution, corresponding to the monomeric and trimeric species, with sedimentation coefficients around 2.0 and 3.5 S, respectively. The DLS data showed that the apo-HbGp form is very unstable when monitored for long times as compared to the HbGp oxy-form. In the time-resolved fluorescence study of apo-HbGp the predominance of long lifetimes was observed. This occurs because the heme groups that promote the tryptophan quenching of fluorescence in the native HbGp were removed. Three lifetimes are observed, two long in the nanosecond and one in the sub-nanosecond time ranges.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Estrutura do grupo heme; (b) Representação do Fe do grupo heme ligado a um nitrogênio da histidina proximal e a uma molécula de O ₂	20
Figura 2: Representação esquemática da estrutura oligomérica da HbGp e subunidades obtida a partir da análise dos dados cristalográficos.	23
Figura 3: FITC reage com composto contendo amina para produzir uma ligação isotioureia.	25
Figura 4: Estrutura química da sonda 1,8 ANS [39].	27
Figura 5: Fotografia do anelídeo <i>Glossoscolex paulistus</i> após ter sido anestesiado em atmosfera de éter etílico.	34
Figura 6: Diagrama representativo das transições eletrônicas.	42
Figura 7: Níveis de energia dos elétrons em uma molécula, representada em função de coordenadas nucleares Q. As linhas horizontais correspondem aos níveis vibracionais dos núcleos da molécula. Os números correspondem: (1) absorção de luz; (2) relaxação da molécula no estado eletrônico excitado; (3) emissão fluorescente; (4) relaxação da molécula no estado eletrônico fundamental.	44
Figura 8: (A) Flutuações na intensidade de luz espalhada devido a interferências construtivas e destrutivas. (B) Função de autocorrelação (correlograma) gerado pelo software para estimar o R _h [57].	49
Figura 9: (A) Espectros de absorção óptica da oxi-HbGp (0,1 mg mL ⁻¹) modificada pela sonda FITC, na presença de diferentes concentrações de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L ⁻¹ , pH 7,0. (B) Gráficos da absorbância na banda de Soret (415 nm) representado pelos quadrados vermelhos e do comprimento de onda no máximo da banda de Soret representado pelos círculos azuis, em função da concentração de ureia.	57
Figura 10: (A) Espectros de emissão de fluorescência da oxi-HbGp (0,1 mg mL ⁻¹) marcada com FITC, na presença de diferentes concentrações de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L ⁻¹ , pH 7,0 com excitação em 295 nm. (B) Gráficos das áreas referentes ao pico I e pico II, normalizadas em relação à concentração de 0,0 mmol L ⁻¹ de ureia, em função da concentração de desnaturante. (C) Gráficos da variação do comprimento de	

onda de emissão de fluorescência do pico I e espalhamento de luz medido no fluorímetro, em função da concentração de ureia59

Figura 11: (A) Espectros de emissão de fluorescência da oxi-HbGp modificada por FITC ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$), na presença de diferentes concentrações de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0 com excitação em 480 nm. (B) Gráficos das áreas, referentes ao pico II da Figura 10A (exc 295 nm) e da Figura 11A (exc 480 nm) normalizadas a partir da concentração de $0,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia, em função da concentração de desnaturante.....60

Figura 12: Decaimentos da intensidade de fluorescência da oxi-HbGp pura (A) e da oxi-HbGp marcada com FITC (B) na razão sonda/heme de 1:5, na presença de diferentes concentrações indicadas de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0. $\lambda_{\text{ex}} = 294 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$, e os respectivos pulsos de excitação.....63

Figura 13: Anisotropia do estado estacionário de FITC ligada à proteína.....67

Figura 14: (A) Decaimentos da anisotropia de fluorescência da sonda FITC em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} e de FITC ligada a oxi-HbGp. (B) Decaimentos da anisotropia de fluorescência da sonda FITC ligada a oxi-HbGp, na presença de 1,0 e 6,0 mol L^{-1} de ureia.....70

Figura 15: Curva padrão da absorbância medida em 562 nm em função da concentração de BSA, onde o protocolo do kit “BCA – Protein Assay Kit (PIERCE)” foi usado.....75

Figura 16: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da oxi-HbGp e da apo-HbGp. As massas moleculares de proteínas padrão, na faixa de 250-10 kDa, e são indicadas do lado esquerdo da figura pela letra S. (A) Eletroforese em gel na ausência de 2-mercaptoetanol e (B) com o agente redutor. Os poços indicados pelos algarismos romanos I, II e III correspondem a oxi-HbGp em concentrações crescentes enquanto que os poços IV, V e VI referem-se às concentrações crescentes da apo-HbGp.....76

Figura 17: Distribuições contínuas dos coeficientes de sedimentação da apo-HbGp, em 50 mmol L^{-1} de fosfato de sódio, pH 7,0 a 20°C . (A) Curvas na ausência de NaCl e (B) curvas na presença de 50 mmol L^{-1} de NaCl. Os valores de $s_{20,w}$ para cada concentração foram determinados como o valor máximo dos picos das curvas de c (S). A Absorbância foi monitorada em 280 nm.....79

- Figura 18:** Curvas da distribuição de intensidade de espalhamento para apo-HbGp (A) 0,7 mg mL⁻¹. (B) 1,4 mg mL⁻¹. (C) 0,7 mg mL⁻¹ na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl.82
- Figura 19:** Curvas de distribuição do número de partículas para apo-HbGp (A) 0,7 mg mL⁻¹. (B) 1,4 mg mL⁻¹. (C) 0,7 mg mL⁻¹ na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl.84
- Figura 20:** Espectros de absorção óptica da apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) e da oxi-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0.85
- Figura 21:** Espectros de dicroísmo circular (CD) da oxi-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) e da apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹), em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 7,0, na região das ligações peptídicas (A) e do grupo heme (B).86
- Figura 22:** Espectros de emissão de fluorescência da apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) e da oxi-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0 com excitação em 295 nm. O inserto corresponde à expansão da figura mostrando a curva da oxi-HbGp. Observe a diferença nos valores das ordenadas.87
- Figura 23:** (A) Espectros de absorção óptica da Apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹), na presença da sonda ANS, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0. (B) Gráfico da absorbância na banda dos aminoácidos (280 nm) em função da concentração de ANS. .88
- Figura 24:** (A) Espectros de emissão de fluorescência da apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) na presença de diferentes concentrações da sonda ANS em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0, com excitação em 295 nm. (B) Gráficos das áreas do pico I e pico II, em função da concentração de ANS. (C) e (D) Gráficos das áreas e (D) do máximo de emissão de fluorescência referente ao pico II em função da concentração da sonda ANS.89
- Figura 25:** (A) Espectros de emissão de fluorescência da apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) com diferentes concentrações de ureia e na presença de 10 µmol L⁻¹ de ANS, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0 com excitação em 295 nm. (B) Gráfico das áreas referentes ao pico I do espectro de emissão de fluorescência normalizadas a partir da concentração de 0,0 mmol L⁻¹ de ureia, em função da concentração do desnaturante. (C) Gráfico do deslocamento do comprimento de onda do máximo de emissão de fluorescência referente ao pico I, em função da concentração de ureia.91
- Figura 26:** (A) Espectros de emissão de fluorescência da sonda ANS (10 µmol L⁻¹) ligada a apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹), na presença e na ausência de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0. (B) Gráfico da área total de emissão de fluorescência

normalizada a partir da concentração de 0,0 mmol L⁻¹ de ureia. (C) Gráfico do deslocamento do máximo de emissão de fluorescência (λ_{em}^{max}) em função da concentração de ureia. λ_{exc} = 350 nm.92

Figura 27: Decaimentos da intensidade de fluorescência da apo-HbGp em tampão puro e na presença de 4 mol L⁻¹ de ureia (A) e da apo-HbGp na presença de 10 e 20 μ mol L⁻¹ de ANS (B), em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0. λ_{ex} = 294 nm e λ_{em} = 340 nm.94

Figura 28: Decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda ANS 10 e 20 μ mol L⁻¹ ligada a apo-HbGp, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0. λ_{ex} = 292 nm e λ_{em} = 475 nm.96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Preparação da diluição da proteína padrão BSA na faixa de 2,0 a 0,125 mg mL ⁻¹ de acordo com o kit BCA – Protein Assay Kit (PIERCE)	38
Tabela 2: Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo para a oxi-HbGp nativa (0,1 mg mL ⁻¹) em tampão fosfato 30 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, em diferentes concentrações de ureia, λ_{ex} = 294 nm e λ_{em} = 340 nm.	62
Tabela 3: Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo para a oxi-HbGp marcada com FITC (0,1 mg mL ⁻¹) na razão sonda/heme de 1:5, em tampão fosfato 30 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, em diferentes concentrações de ureia, λ_{ex} = 294 nm e λ_{em} = 340 nm.	64
Tabela 4: Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo para FITC pura e para FITC ligada a oxi-HbGp (0,1 mg mL ⁻¹) na razão sonda/heme de 1:5, em tampão fosfato 30 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, em diferentes concentrações de ureia. λ_{ex} = 492 nm e λ_{em} = 515 nm..	66
Tabela 5: Resultados dos ajustes de decaimento da anisotropia de fluorescência: tempo de correlação rotacional (θ); anisotropia de tempo zero (r_0) e anisotropia em tempo residual (r_∞) da sonda FITC ligada a proteína, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, com excitação em 492 nm e emissão em 515 nm, η é a viscosidade da solução..	70
Tabela 6: Valores de absorbâncias em 562 nm da BSA e apo-HbGp.	73
Tabela 7: Massas moleculares das subunidades da apo-HbGp, obtidas por eletroforese SDS-PAGE, na ausência e presença de β -mercaptoetanol.	76
Tabela 8: Propriedades hidrodinâmicas das subunidades da apo-HbGp determinadas por velocidade de sedimentação (SV) em tampão fosfato de sódio 50 mmol L ⁻¹ , no pH 7,0, a 20 °C, onde ($s_{20,w}$) em (S) representa os coeficientes de sedimentação, (MM) as massas moleculares em (kDa), (R_s) os raios de Stokes em (nm) e as áreas dos picos em (%). Os experimentos foram realizados na presença e ausência de NaCl..	80
Tabela 9: Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo da apo-HbGp (0,14 mg mL ⁻¹) em tampão fosfato de sódio 30 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, na presença de diferentes sistemas. λ_{exc} = 292 nm e λ_{em} = 340 nm.	92
Tabela 10: Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo da sonda ANS em tampão fosfato 30 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, na presença da apoHbGp. λ_{exc} = 292nm e λ_{em} = 475 nm.	94

LISTA DE ABREVIACÕES E SBOLOS

a – Cadeia polipeptídica globínica (***a***) da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

abc –Espécie trimérica da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

abcd–Subunidade tetramérica da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

(***abcd***)₃ – Dodecmero da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

AUC- Analytical Ultracentrifugation

1,8-ANS - 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato.

b –Cadeia polipeptdica globnica (***b***) da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

BSA – do ingls Bovine serum albumin.

c –Cadeia polipeptdica globnica (***c***) da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*

CD- dichroism Circular

CTAC- cloreto de cetiltrimetilamnio

DLS- Dynamic Light Scattering

DMSO – Dimetil sulfóxido.

DTAB– brometo de dodeciltrimetilamônio.

FITC – fluoresceína isotiocianato.

GuHCl – Cloridrato de guanidina

HbGp – Hemoglobina do anelídeo *Glossoscolex paulistus*.

HbLt – Hemoglobina do anelídeo *Lumbricus terrestris*.

HbAm – Hemoglobina do anelídeo *Arenicola marina*.

Hbs – hemoglobinas

SDS- dodecil sulfato de sódio.

SEC- Size Exclusion Chromatography

TCSPC – Contagem de fóton único correlacionado no tempo do inglês “Time Correlated Single Photon Counting”.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	15
CAPÍTULO 1	19
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Hemoproteínas.....	20
1.2 A Hemoglobina gigante de <i>Glossoscolex paulistus</i> (HbGp).....	22
1.2.1 Características da sonda Fluoresceína Isotiocianato (FITC).	24
1.3 A apo-hemoglobina de <i>Glossoscolex paulistus</i>	26
1.3.1 Características gerais da sonda 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (1,8-ANS).....	27
CAPÍTULO 2	29
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
CAPÍTULO 3	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1.1 MATERIAIS	33
3.1.2 MÉTODOS.....	33
3.1.2.1 Extração e purificação da HbGp.....	33
3.1.2.2 Reação de marcação da oxi-HbGp com FITC.....	34
3.1.2.3 Preparação das amostras da oxi-HbGp nativa e da oxi-HbGp marcada com FITC	35

3.1.2.4 Parâmetros experimentais utilizados nas medidas espectroscópicas.....	35
3.1.3Preparação da forma Apo-HbGp	36
3.1.3.1 Determinação da concentração da apo-HbGp pelo método de Smith	37
3.1.3.2 Medidas de eletroferese SDS-PAGE.....	38
3.1.3.3 Medidas de ultracentrifugação analítica	38
3.1.3.3.1 Análise dos dados de ultracentrifugação analítica.....	39
3.1.3.4 Medidas de DLS	39
3.1.3.5 Preparação das amostras da Apo-HbGp para as medidas espectroscópicas.	40
3.1.3.6 Parâmetros experimentais utilizados nas medidas espectroscópicas.....	40
3.3 TÉCNICAS DE ESTUDO	41
3.3.1 Absorção óptica	41
3.3.2 Fluorescência	43
3.3.2.1 Anisotropia de fluorescência	46
3.3.2.2 Decaimento de anisotropia de fluorescência	47
3.3.3 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)	48
3.3.4 Ultracentrifugação Analítica (AUC)	50
3.3.5 Dicroísmo circular	52
CAPÍTULO 4	54
PARTE I.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
4.1 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DA HbGp MODIFICADA PELA SONDA DE FLUORESCÊNCIA FITC.....	56
4.1.1 Efeitos das diferentes concentrações de ureia na oxi-HbGp modificada com FITC	56
4.1.1.1 Dados de absorção óptica	56
4.1.1.2 Dados de fluorescência estática.....	57
4.1.1.3 Dados de fluorescência resolvida no tempo	61
4.1.1.3.1 Emissão dos triptofanos da HbGp	61

4.1.1.3.2 Emissão da sonda FITC ligada a oxi-HbGp	65
4.1.1.4 Dados de anisotropia de fluorescência	66
4.1.1.4.1 Dados de anisotropia de fluorescência estática da sonda FITC ligada à proteína	66
4.1.1.4.2 Dados de anisotropia resolvida no tempo da sonda FITC ligada à proteína	67
4.2 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DA APO-HbGp EXTRAÍDA DA HbGp, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA Sonda DE FLUORESCÊNCIA ANS.....	74
4.2.1 Determinação da concentração da apo-HbGp	74
4.2.2 Eletroforese SDS-PAGE da apo-HbGp.....	75
4.2.2 Eletroforese SDS-PAGE da apo-HbGp.....	75
4.2.3 Dados de ultracentrifugação analítica (AUC) da apo-HbGp.....	78
4.2.4 Dados de espalhamento dinâmico de luz(DLS) da apo-HbGp.....	81
4.2.5 Dados de absorção óptica, dicroísmo circular e fluorescência estática da apo-HbGp	85
4.2.6 Apo-HbGp em concentrações diferentes de ANS	87
4.2.7 Efeitos das diferentes concentrações de ureia na estrutura da apo-HbGp e da sonda ANS.....	90
4.2.8 Dados de fluorescência resolvida no tempo	92
4.2.8 Dados de fluorescência resolvida no tempo	92
4.2.8.1 Emissão dos triptofanos da apo-HbGp	93
4.2.8.2 Emissão da sonda ANS ligada a apo-HbGp	95
CAPÍTULO 5	97
5 Conclusões.....	98
REFERÊNCIAS	100

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemoproteínas

As hemoproteínas são caracterizadas por apresentarem uma unidade não peptídica (grupo prostético), denominada grupo heme [1] (Figura 1). Este grupo heme é responsável pela principal função da mioglobina (Mb) e da hemoglobina (Hb) que é ligar-se ao oxigênio de forma reversível, uma vez que essas proteínas atuam como proteína armazenadora e carreadora de oxigênio, respectivamente [2]. Além disso, o grupo heme confere a coloração vermelha ao músculo (mioglobina) e ao sangue (hemoglobina) [3]. A mioglobina é encontrada em quase todos os mamíferos, essencialmente no tecido muscular. Por outro lado, a hemoglobina é encontrada nos eritrócitos, ou seja, nos glóbulos vermelhos do sangue dos vertebrados. Entretanto, em alguns invertebrados a hemoglobina encontra-se dissolvida na hemolinfa como é o caso de certas espécies de anelídeos, moluscos, artrópodes e nematelmintos.

Figura 1:(a) Estrutura do grupo heme; (b) Representação do Fe do grupo heme ligado a um nitrogênio da histidina proximal e a uma molécula de O₂.

Fonte: NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: Almed, 2011. 1119 p.

O grupo heme é formado por uma parte orgânica e por um átomo de ferro. Esta parte orgânica denominada protoporfirina é constituída de quatro anéis pirrólicos ligados por pontes metênicas, formando um anel tetrapirrólico [1]. As cadeias laterais ligadas a esse anel são:

quatro metilas, duas vinilas e dois propionatos [3]. O átomo de ferro localiza-se no centro da protoporfirina e se liga a quatro átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos (Figura 1). Este átomo de ferro pode apresentar duas ligações adicionais denominadas de quinta e sexta posições de coordenação. A quinta posição é ocupada por uma histidina denominada histidina proximal, enquanto que a sexta posição é geralmente coordenada pela molécula de oxigênio (O_2) ou por outras moléculas ligantes, tais como CO, NO, H_2O , H_2S , etc [5].

Convém mencionar, que apesar das proteínas, mioglobina e hemoglobina, apresentarem funções e características bastante similares, a hemoglobina destaca-se por ser mais eficaz em usar o seu potencial de transportar oxigênio (90%) do que a mioglobina (7%) [3]. E isso acontece devido à estrutura dessas proteínas, visto que, a mioglobina possui uma única cadeia peptídica e um único heme, ao passo que a hemoglobina é uma proteína tetramérica, ou seja, possui quatro cadeias onde cada uma delas contém um grupo heme. Essas cadeias na hemoglobina ligam a molécula de oxigênio de forma cooperativa, isto é, a ligação de oxigênio molecular em um grupo heme facilita a ligação de oxigênio molecular nos outros grupos hemes do mesmo tetrâmero [1].

É importante destacar, que as hemoglobinas (Hbs) transportam oxigênio molecular tanto em vertebrados como em invertebrados [6]. Porém, as Hbs dos invertebrados apresentam uma grande mudança nas estruturas quaternárias e estão presentes em meios biológicos diversificados, tais como, células vermelhas ou dissolvidas livremente nos fluidos biológicos, citoplasma de tecidos característicos (músculos, nervos, gametas, etc) [2].

Um dos grupos pertencentes às Hbs de invertebrados é o grupo das hemoglobinas extracelulares gigantes, também conhecidas como eritrocrorinas. Estas hemoglobinas apresentam uma grande massa molecular em torno de 3600 kDa [7-9]. Dentro desta classe de proteínas destacam-se as hemoglobinas de várias espécies, tais como: hemoglobinas de *Glossoscolex paulistus* (HbGp), *Lumbricus terrestris* (HbLt) e a *Arenicola marina* (HbAm). Estas hemoproteínas apresentam alta resistência ao desenovelamento quando expostas a condições de estresse tais como: adição de agentes desnaturantes, variações de temperatura e de pH [10-12]. Convém mencionar ainda que as hemoglobinas HbLt e HbAm têm sido estudadas como possíveis modelos para desenvolver substitutos sanguíneos [13].

Neste sentido existe uma empresa de biotecnologia, a Hemarina S.A., fundada em 2007, localizada em Morlaix na França. Esta empresa está envolvida com a pesquisa e desenvolvimento de transportadores de oxigênio baseados numa hemoglobina extracelular de um anelídeo marinho (HbAm) para aplicações terapêuticas e industriais. Esta empresa oferece um produto denominado de *HEMO₂life* que é um aditivo para soluções de preservação

de órgãos para transplantes que permite a oxigenação de órgãos e minimiza o risco de rejeição. Outro produto fornecido por esta empresa é o *HEMHealing*, uma solução terapêutica de oxigenação para feridas hipóxicas e crônicas (úlceras do pé diabético, úlceras de pressão, etc). O *HEMOXYCarrier* é mais um produto da empresa que é um transportador de oxigênio universal que permite a recuperação da oxigenação sem os efeitos colaterais adversos (principalmente vasoconstrição) causados pela primeira geração de carreadores de oxigênio baseados na hemoglobina [14].

Outro aspecto que convém mencionar é que o Professor Yannick Le Meur e colaboradores apresentaram na sessão de pôsteres no congresso de transplantes de órgãos no ATC (American Transplant Congress) em Seattle, no dia 6 de junho de 2018, um estudo realizado em seis centros franceses de transplantes, onde os sessenta pacientes que haviam recebido um rim que tinha sido preservado em uma solução contendo o aditivo *HEMO₂life* foram acompanhados por um ano e apresentaram os seguintes resultados: nenhuma morte, nenhum efeito imunológico, alérgico ou pró-trombótico, nenhuma perda de enxerto relacionado ao produto, de acordo com o IDSMB (Independent Data Safety Monitoring Board) [14]. Diante desses resultados promissores, pode-se dizer que foi dado o primeiro passo de uma nova era na preservação de órgãos. Com isso, espera-se que ocorra no futuro próximo uma redução na escassez mundial de órgãos disponíveis para transplante.

1.2 A Hemoglobina gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp)

A HbGp é uma hemoglobina gigante presente na minhoca *Glossoscolex paulistus*, endêmica do Estado de São Paulo [15]. Estudos cristalográficos mostram que a estrutura oligomérica da HbGp é bastante semelhante à da HbLt [16,17], sendo composta por doze protômeros (**abcd**)₃L₃, constituídos por doze cadeias globínicas com massa molecular na faixa de 16-19 kDa, e três subunidades sem o grupo heme, denominadas linkers, com massa molecular em torno de 25 kDa [16,17]. As cadeias de globina **a**, **b**, **c** e **d** formam um tetrâmero assimétrico **abcd**, composto por um trímero **abc** ligado por ligações dissulfeto e pela subunidade monomérica **d**, similar à mioglobina. A HbGp nativa é caracterizada por possuir uma massa molecular de 3.600 kDa, um coeficiente de sedimentação de 58 S e diâmetro hidrodinâmico de 27-28 nm [9,18].

Figura 2: Representação esquemática da estrutura oligomérica da HbGp e subunidades obtida a partir da análise dos dados cristalográficos.

Fonte: Autoria própria.

Estudos espectroscópicos e hidrodinâmicos têm mostrado que a HbGp é muito estável, uma vez que quando submetida a uma temperatura de até 52° C, o diâmetro hidrodinâmico permanece constante em torno de 27-28 nm [18,19]. Tendo em vista isso, pode-se afirmar que a estabilidade da HbGp se sobressai em comparação com a hemoglobina humana que quando submetida a uma temperatura de 45° C encontra-se desnaturada [20]. Além disso, estudos anteriores de cinética de auto-oxidação mostraram que a HbGp pode ser estocada por longos períodos de tempo sem apresentar perda significativa da sua função biológica [21]. Diferentemente das estruturas das hemoglobinas de mamíferos, as estruturas das hemoglobinas gigantes dos anelídeos, apresentam íons inorgânicos na sua constituição [17], que estão, provavelmente, associados à alta estabilidade e propriedades de oxigenação destes sistemas. Em condições desnaturantes, tais como, ambiente alcalino, e concentrações altas dos desnaturantes ureia e cloridrato de guanidina, a HbGp dissocia-se em diferentes subunidades, tais como, dodecâmero **(abcd)**₃, tetrâmero **abcd**, trímero **abc** e o monômero **d** (Figura 2).

Carvalho e colaboradores [12,22] mostraram que a dissociação oligomérica da HbGp depende da concentração de proteína, do estado de oxidação do ferro do grupo heme e do ligante da sexta posição de coordenação do grupo heme. Por exemplo, quando a sexta posição de coordenação é ocupada por uma molécula de água tem-se a forma meta-HbGp e neste caso a proteína é menos estável quando comparada a forma oxi-HbGp e cianomet-HbGp, cujo

ligante é o íon cianeto (CN^-). Vale salientar que o estado de oxidação das espécies meta-HbGp e cianometa-HbGp é Fe^{3+} .

Estudos prévios de estabilidade da HbGp na presença dos agentes desnaturantes brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), cloridrato de guanidina (GuHCl) e ureia monitorados pela sonda fluorescente 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (1,8-ANS), que se liga às macromoléculas de forma não covalente, mostraram que em concentrações maiores do que 1,5 de GuHCl e 4,0 mol L^{-1} de ureia, ocorre o desdobramento completo da oxi-HbGp, com redução dos grupos hidrofóbicos na superfície da proteína, ocorrendo também deslocamento da sonda 1,8-ANS para o solvente, detectado pela redução na intensidade de emissão de fluorescência [23]. Além disso, os resultados obtidos com o DTAB, no pH 7,0, mostraram que esse surfactante provoca a oxidação do ferro do grupo heme, a dissociação oligomérica, a agregação e o desdobramento parcial da oxi-HbGp [21].

Por outro lado, no presente estudo a sonda fluoresceína isotiocianato (FITC) que se liga covalentemente às macromoléculas foi utilizada para modificar a oxi-HbGp.

1.2.1 Características da sonda Fluoresceína Isotiocianato (FITC).

FITC é uma sonda com alto rendimento quântico de fluorescência e provavelmente a sonda mais popular no estudo de proteínas. Esta sonda derivada da fluoresceína é sintetizada pela modificação de seu anel inferior nas posições 5 ou 6 de carbonos. Os dois isômeros resultantes são quase idênticos em suas reatividades e propriedades espectrais, incluindo comprimentos de onda e intensidades de excitação e emissão [24]. O grupo isotiocianato desta sonda reage com nucleófilos como aminas, sulfidrilas e o íon fenolato de cadeias laterais de tirosina. O único produto estável, no entanto, é quando reage com grupos de aminas primárias, assim FITC é quase inteiramente seletiva para modificação de aminas e N-terminais em proteínas [24,25]. A reação envolve ataque do nucleófilo ao carbono eletrofílico central do grupo isotiocianato (Figura 3). O deslocamento de elétrons resultante produz uma ligação tioureia entre FITC e a proteína sem grupo abandonante [24].

Figura 3: FITC reage com composto contendo amina para produzir uma ligação isotioureia.

Fonte: HERMANSON, G.T. **Bioconjugate Techniques**. Illinois. Academic Press, 1996. 785p.

A sonda FITC pode ser dissolvida em DMSO como solução estoque concentrada antes de sua adição a uma mistura reacional aquosa. FITC é razoavelmente estável em solução aquosa por curtos períodos, mas degrada com o passar do tempo. Esta sonda pode perder atividade durante o armazenamento, por isso, o armazenamento deve ser feito sob condições dessecadas, protegida da luz, e a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [24]. Esta sonda em solução aquosa absorve com comprimento de onda máximo de 480 nm e apresenta um máximo de emissão centrado em 520 nm. Vale ressaltar que os comprimentos de onda de absorção e emissão dessa sonda não mostram mudanças significativas quando esta sonda está ligada à proteína. No entanto, o rendimento quântico da sonda é reduzido drasticamente com a ligação da sonda a proteína, isto é, a fluorescência da sonda é suprimida [26,27].

Considerando que a reação de marcação de FITC não induz o desenovelamento das macromoléculas, esta sonda pode ser utilizada como uma ferramenta poderosa para monitorar mudanças conformacionais em proteínas. Em vista disso, neste estudo a sonda FITC foi usada para monitorar o efeito do agente desnaturante ureia na oxi-HbGp, através das técnicas: absorção óptica, fluorescência estática e resolvida no tempo, anisotropia e decaimento de anisotropia de Fluorescência.

1.3 A apo-hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*

Como foi mencionado anteriormente, as hemoproteínas apresentam cadeias polipeptídicas, e um grupo cromóforo, não peptídico, denominado grupo heme [1]. As propriedades dessa classe de proteínas dependem fortemente da natureza desse grupo heme [28]. Esse grupo pode ser removido da holoproteína, proteína completa constituída pela sua cadeia polipeptídica e seu grupo prostético, através de vários métodos resultando na forma apo-proteína [29-31]. A falta do grupo prostético leva as cadeias globina da forma apo- a precipitarem facilmente, indicando que o grupo heme desempenha um papel fundamental na estabilização das estruturas dessas proteínas [32].

Assim, muitos pesquisadores têm usado a forma apo-proteína para produzirem uma proteína reconstituída com o grupo heme modificado artificialmente. Tendo como propósito investigar as estruturas, propriedades físico-químicas e reatividades das hemoproteínas reconstituídas [33]. Os químicos e bioquímicos tem mostrado bastante interesse na substituição do grupo prostético das hemoproteínas. Isso pode ser uma estratégia útil para investigar a química de coordenação biológica, uma vez que, o bolsão do grupo heme fornece ligantes axiais para o ferro do grupo heme e estabilizam espécies de metais lábeis [33]. Além disso, a substituição por um grupo heme artificial é vantajosa na engenharia de hemoproteínas porque é esperado que a reconstituição de uma dada hemoproteína através de um grupo prostético não nativo pode ter o efeito de regular determinadas propriedades e pode até fornecer novas funções [33].

É importante destacar que há uma variedade grande de pesquisas sobre apo-proteína preparada a partir da mioglobina que é caracterizada por apresentar apenas um grupo heme [28,34-36]. Por outro lado, são poucas as pesquisas de apo-proteínas preparadas a partir de hemoglobinas, pois essas macromoléculas são bem mais complexas, principalmente as da classe de hemoglobinas extracelulares gigantes, também conhecidas como eritrocruorinas, que possuem 144 grupos hemes [37]. Neste trabalho foi preparada a apo-proteína a partir da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) presente na minhoca *Glossoscolex paulistus*.

Levando-se em consideração esses aspectos, um estudo de caracterização da forma apo-HbGp foi realizado através das técnicas de ultracentrifugação analítica (AUC), eletroforese e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Além disso, a apo-HbGp foi

caracterizada, na ausência e presença da sonda 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (1,8-ANS), através das técnicas de absorção óptica, fluorescência estática e resolvida no tempo.

1.3.1 Características gerais da sonda 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (1,8-ANS).

1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato é uma sonda fluorescente amplamente utilizada na caracterização de sítios de ligação de proteínas. Essa sonda é considerada uma ferramenta valiosa para a análise de uma variedade de ligantes incluindo moléculas de drogas, devido à capacidade de detectar e caracterizar vários locais de ligação [38]. Estudos da estrutura cristalina dos complexos ANS-proteína mostram que para algumas proteínas, a ligação do ANS depende principalmente do emparelhamento do íon da sonda com cadeias carregadas positivamente, isto é, essa ligação ocorre entre as cadeias laterais de arginina, lisina e histidina, todos os aminoácidos carregados positivamente, e o grupo sulfonato do ANS [38,39].

Figura 4: Estrutura química da sonda 1,8 ANS [39].

Fonte: HAWE, A.; SUTTER, M.; JISKOOT. Extinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n.7, p.1487-1499, 2007.

As propriedades fotofísicas do ANS são complexas. O rendimento quântico e a energia de emissão são afetados pela polaridade, viscosidade do solvente e temperatura [38]. As transições eletrônicas devido à excitação são tipicamente acompanhadas de uma mudança nos dipolos da sonda, ou seja, podem reorientar-se ou relaxar em torno do momento de dipolo, diminuindo a energia do estado excitado [40]. Além disso, se as moléculas do solvente também possuem um momento de dipolo, reorientação de moléculas do solvente em torno das

moléculas da sonda no estado excitado para posições energeticamente mais favoráveis podem ocorrer, e este processo é conhecido por relaxação do solvente [40]. Em soluções de viscosidade baixa onde estas relaxações são mais rápidas, praticamente todas as moléculas de ANS relaxam para o estado fundamental antes da emissão do fóton. Por outro lado, em soluções de viscosidade maior, as relaxações das moléculas de ANS ocorrem lentamente. Sendo assim, várias moléculas da sonda emitirão o fóton antes de alcançar o equilíbrio do estado excitado [40].

Cabe mencionar que esta sonda 1,8-ANS tem sido extensivamente usada como sonda fluorescente de sítios de ligação hidrofóbicos em diversos sistemas biológicos incluindo proteínas, membranas, organelas celulares e células intactas [41]. Esta sonda é também bastante usada para detectar os estados intermediários “molten globule” observados no enovelamento de várias proteínas [41]. Além disso, muitos estudos têm demonstrado a eficiência desta sonda na caracterização de apo-proteínas [42,43]. No presente estudo esta sonda foi usada para caracterizar a forma apo- da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho de doutorado propõe o estudo da estabilidade da proteína nativa oxi-HbGp e da forma apo-HbGp, onde os grupos hemes foram extraídos, relacionada aos processos de dissociação oligomérica e desnaturação em diversas condições experimentais. A presença do agente caotrópico ureia foi utilizada como agente externo indutor das alterações das proteínas. A oxi-HbGp foi modificada pela sonda de fluorescência fluoresceína isotiocianato (FITC) que se liga de forma covalente, enquanto a apo-HbGp foi caracterizada na ausência e presença da sonda fluorescente 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (1,8-ANS). Essas sondas espectroscópicas permitiram monitorar as alterações das proteínas através das mudanças espectrais. Convém mencionar ainda que o uso de sondas fluorescentes para o estudo dessa proteína que pertence a classe das hemoproteínas extracelulares gigantes é inédito, bem como, a caracterização da apo-HbGp.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Estudar a dissociação e desnaturação da oxi-HbGp modificada com FITC, na presença do agente caotrópico ureia, na faixa de concentração 0 a 8 mol L⁻¹, por absorção óptica, espalhamento de luz no fluorímetro, emissão de fluorescência estática e resolvida no tempo (tempos de vida de fluorescência) a 25 °C.
- 2) Avaliar a dinâmica da sonda FITC ligada à oxi-HbGp através da anisotropia de fluorescência estática e resolvida no tempo (decaimento de anisotropia);
- 3) Caracterizar as espécies presentes em equilíbrio da apo-HbGp, através das técnicas de eletroforese, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e ultracentrifugação analítica (AUC);

4) Investigar por dicroísmo circular (CD), absorção óptica, fluorescência estática e resolvida no tempo (tempos de vida de fluorescência), a 25 °C, a apo-HbGp na ausência e na presença da sonda fluorescente 1,8-ANS.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 MATERIAIS

Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) foi extraída e purificada como descrito na sequência. [Fluoresceína isotiocianato, isômero I (F.7250), 4-isotio-2,2,6,6-tetrametil-piperidino-1-oxil], ureia, tampões fosfato de sódio e Tris- HCl foram adquiridos da Sigma Aldrich. A concentração da solução estoque de ureia foi estimada usando o procedimento descrito em Pace et al [44]. O derivado do ácido esteárico 16-doxil estearato também foi obtido da Sigma Aldrich.

A sonda de fluorescência 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (1,8-ANS) foi adquirida da Sigma Aldrich. Para as medidas de eletroforese SDS-PAGE foram usados acrilamida, β -mercaptoetanol, padrão de peso molecular *Precision Plus Protein*, corante Comassie Brilliante Blue R-250 da Bio-Rad. Além disso, na determinação da concentração da apo-HbGp foi utilizado o kit “BCA – Protein Assay Kit da PIERCE”.

3.1.2 MÉTODOS

3.1.2.1 Extração e purificação da HbGp

A hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) foi extraída do anelídeo *Glossoscolex paulistus*. Esta minhoca é encontrada nas cidades de Rio Claro e Piracicaba no Estado de São Paulo. O processo de extração inicia-se com anestesia das minhocas com éter por um período de 15 a 20 minutos. Posteriormente é feita uma incisão na parte superior do animal com o propósito de coletar a hemolinfa. Na sequência, a amostra coletada é mantida a 4 °C em tampão Tris-HCl na presença do anticoagulante citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 [12].

Figura 5: Fotografia do anelídeo *Glossoscolex paulistus* após ter sido anestesiado em atmosfera de éter etílico.

Fonte: Autoria própria.

Em seguida, a amostra de hemolinfa extraída da minhoca foi centrifugada a 5.000 rpm por quinze minutos a 4 °C para eliminar as impurezas, e na sequência foi ultrafiltrada em uma membrana de corte de 30 kDa contra tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, por 24 horas. A amostra foi ultracentrifugada a 50.000 rpm por 3,5 h a 4 °C com a finalidade de retirar contaminantes proteicos de baixo peso molecular. Após esta etapa e o descarte do sobrenadante forma-se o precipitado (pellet) formado no fundo do tubo que é ressolubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Na etapa final de purificação a amostra é filtrada numa coluna de gel Sephadex G-200. A concentração da HbGp foi obtida espectrofotometricamente, usando o espectrofotômetro Shimadzu modelo 1601P e o coeficiente de extinção molar da oxi-HbGp $\epsilon_{415\text{ nm}} = 5,5 \pm 0,8 \text{ (mg/mL)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [12].

3.1.2.2 Reação de marcação da oxi-HbGp com FITC

Primeiramente um estoque concentrado da oxi-HbGp foi dialisado por 24 horas contra tampão fosfato 30 mmol L⁻¹, pH 7,0, para remover o tampão Tris-HCl, pois esse tampão inibe a reação de marcação. A solução estoque de FITC foi preparada em DMSO anidro para evitar sua decomposição em água. No entanto, para a reação de marcação, uma diluição da solução estoque foi preparada em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹ instantes antes da marcação da proteína com a sonda. A reação de marcação foi realizada usando uma solução de oxi-HbGp

3,0 mg mL⁻¹, que corresponde a 120 µmol L⁻¹ de heme, na proporção FITC: HbGp de 1:5 relativa ao heme (24 µmol L⁻¹ de FITC). A mistura foi incubada por 24 horas, em contínua agitação a uma temperatura de 4 °C. Após a reação, a mistura foi dialisada por 24 horas contra tampão fosfato de sódio para remover a sonda FITC livre que não reagiu.

3.1.2.3 Preparação das amostras da oxi-HbGp nativa e da oxi-HbGp marcada com FITC

A partir do estoque concentrado da oxi-HbGp marcada com FITC foram preparadas amostras na presença de ureia, na faixa de concentração de 0,0 a 8,0 mol L⁻¹, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0. A concentração da HbGp modificada foi de 0,1 mg mL⁻¹ para os estudos de absorção óptica, fluorescência estática e anisotropia estática.

Por outro lado, para os estudos de fluorescência resolvida no tempo amostras da oxi-HbGp nativa, não modificada foram preparadas numa concentração fixa de 0,25 mg mL⁻¹, na presença do mesmo agente desnaturante, na faixa de concentração de 1,0 a 6,0 mol L⁻¹, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, em pH 7,0. Além disso, foi preparado outro conjunto de amostras da oxi-HbGp marcada com FITC na presença dos mesmos valores de concentrações de ureia e em condições similares às citadas anteriormente para estudos de decaimento de anisotropia.

3.1.2.4 Parâmetros experimentais utilizados nas medidas espectroscópicas

As medidas de absorção óptica foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu 1401C e os espectros foram coletados na faixa de 250 a 700 nm. Enquanto, as medidas de emissão de fluorescência estática e anisotropia de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro da Hitachi Modelo F-4500, com excitação em 295 nm (triptofanos) e 480 nm (FITC), onde as emissões foram monitoradas, nas faixas de 305 a 575 nm e 485 a 590 nm, respectivamente. As fendas de excitação 2,5 nm e de emissão 5,0 nm foram utilizadas.

Fluorescência resolvida no tempo e decaimentos de anisotropia de fluorescência foram medidos no espectrofluorímetro baseado no método de contagem de fótons únicos por

correlação temporal TCSPC (do inglês Time Correlated Single Photon Counting). O comprimento de onda do laser foi escolhido a partir de cristais de geradores harmônicos (2° e 3°, a partir de 1000 nm), para obter pulsos de 492 nm para excitar a sonda FITC e pulsos de 294 nm para excitar os triptofanos. O equipamento utilizado pertence ao grupo de Fotobiofísica do Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, liderado pelo Professor Dr. Amando Siuiti Ito. Contamos também com a colaboração de Dr^a Marina Berardi Barioni na realização dos experimentos.

3.1.3 Preparação da forma Apo-HbGp

No processo de obtenção da apo-HbGp foi utilizado o método de extração com acetona ácida descrito em Ascoli et al [30], que é indicado para hemoproteínas de alto peso molecular. Inicialmente a oxi-HbGp foi dialisada contra água pura desmineralizada com a finalidade de remover o tampão Tris-HCl porque a solução de hemoglobina precisa estar desprovida de sal. A solução de acetona ácida foi preparada adicionando 250 μL de HCl concentrado em 100 mL de acetona. Em seguida, a 76 mL dessa solução a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi adicionada 1900 μL da solução de hemoglobina sem sal ($30,5\text{ mg mL}^{-1}$) gota a gota sob agitação contínua. No final da adição, a solução de acetona-ácida ficou levemente avermelhada e o precipitado globina apareceu como um material branco rosado. Essa suspensão foi centrifugada a 6.000 rpm em uma centrífuga pré-refrigerada a 4°C durante 15 minutos. Depois disso, o sobrenadante contendo os grupos hemes foi removido cuidadosamente utilizando uma pipeta de Pasteur, e o precipitado foi ressuscitado em 19 mL da solução acetona ácida a 4°C . Na sequência foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente e o sobrenadante foi removido novamente. O precipitado de cor branca (globina) foi dissolvido em 2 mL de água pura desmineralizada gelada. Esta amostra de apo-HbGp obtida foi dialisada primeiro contra uma solução de bicarbonato de sódio 0,1% e, logo em seguida, contra uma solução de tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 7,0. Por fim, a amostra foi centrifugada a 6.000 rpm a 4°C durante 15 minutos para remoção do precipitado de globina desnaturada[30].

3.1.3.1 Determinação da concentração da apo-HbGp pelo método de Smith

O método de Smith, também denominado de método do ácido bicinconínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina) [45], foi usado na determinação da concentração da apo-HbGp. Este método colorimétrico é baseado na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, e consiste em duas etapas: a primeira etapa é a reação do biureto, cuja cor azul fraca resulta da redução de cobre (II) a cobre (I), e a segunda é a reação de quelação, onde o cobre (I) reage com o BCA e produz um complexo, que absorve em 562 nm [45]. Este complexo formado é solúvel em água e apresenta uma absorbância que é praticamente linear com o aumento da concentração de proteína num intervalo de 0,02 a 2,0 mg mL⁻¹. Além disso, este complexo formado de coloração roxa depende da estrutura macromolecular da proteína, do número de ligações peptídicas e da presença de cisteína, cistina, triptofano e tirosina [46]. Assim como nos demais métodos de quantificação de proteína, um protocolo foi seguido. Nesse caso foi utilizado o kit “BCA – Protein Assay Kit (PIERCE)” que, segundo as instruções do fabricante, deve-se também construir uma curva padrão de BSA, cujo procedimento de execução está descrito a seguir:

Primeiramente foram feitas as diluições do padrão BSA partindo do estoque concentrado a 2,0 mg mL⁻¹ até a concentração de 0,125 mg mL⁻¹ como mostra a Tabela 1. As amostras de apo-HbGp de concentrações desconhecidas também foram diluídas em três proporções: 1:40, 1:20 e 1:10. Em seguida foi preparado o reagente principal que foi adicionado às amostras, misturando 50 partes do reagente A com 1 parte do reagente B (proporção de 50:1 para os reagentes A:B). O reagente A é constituído de carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico, tartarato de sódio e hidróxido de sódio enquanto o reagente B é uma solução 4% de cobre penta-hidratado. Na sequência foram pipetados 25 µL da solução padrão (solução de BSA) na faixa de concentração de 0,125 a 2,0 mg mL⁻¹ em duplicata nos respectivos poços, seguido da adição de 200 µL da mistura de reagentes A:B. O mesmo procedimento foi realizado para apo-HbGp e oxi-HbGp. A placa foi coberta e levada para uma estufa bacteriológica da marca MARCONI- Modelo MA -032/480 IN a 37 °C por 30 minutos. A leitura foi feita em 562 nm utilizando um leitor de placas Spectra Max i3 Molecular Device do Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do IFSC, USP, São Carlos.

Tabela 1: Preparação da diluição da proteína padrão BSA na faixa de 2,0 a 0,125 mg mL⁻¹ de acordo com o kit BCA – Protein Assay Kit (PIERCE).

Eppendorf	H ₂ O (μL)	BSA (μL)	BSA (mg mL ⁻¹)
A	0	300 do estoque	2,0
B	125	375	1,5
C	325	325	1,0
D	175	175 do eppendorf B	0,75
E	325	325 do eppendorf C	0,5
F	325	325 do eppendorf E	0,25
G	325	325 do eppendorf F	0,125
H	400	0	0 (Branco)

3.1.3.2 Medidas de eletroforese SDS-PAGE

Para a caracterização da apo-HbGp foram feitos géis de eletroforese SDS-PAGE. Estes géis foram preparados numa percentagem de acrilamida de 15%, pH 8,6. As amostras foram preparadas com e sem o agente redutor β-mercaptoetanol, cujas concentrações foram de 0,14; 0,28 e 0,42 mg mL⁻¹. O padrão de marcadores de massas moleculares conhecidas utilizado foi o “Precision Plus Protein”. As amostras foram pré-aquecidas em um banho a 95 °C durante cinco minutos antes de serem aplicadas nos géis. A eletroforese foi realizada usando tampão Tris-HCl 25 mmol L⁻¹, contendo 192 mmol L⁻¹ de glicina, pH 6,8 e em uma tensão mantida constante em 120 V. Para revelar os géis foi utilizado o corante Comassie Brilliant Blue R-250 para colorir.

3.1.3.3 Medidas de ultracentrifugação analítica

Os experimentos de ultracentrifugação analítica da apo-HbGp, utilizando o método de velocidade de sedimentação, foram realizados em uma ultracentrífuga analítica da Beckman Optima, modelo XL-A do Laboratório de Interação do Patógeno Hospedeiro da UnB, a temperatura constante de 20 °C, utilizando o rotor Na-60 Ti a 40.000 rpm. As curvas de absorção foram monitoradas em função do raio da célula no comprimento de onda de 280 nm. As medidas foram realizadas em três diferentes concentrações 0,30; 0,46 e 0,63 mg mL⁻¹, na ausência e na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl, pH 7,0. A solução estoque da apo-HbGp foi

dialisada por dois dias contra tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹. O último tampão de diálise foi usado como referência nos experimentos.

3.1.3.3.1 Análise dos dados de ultracentrifugação analítica

As propriedades hidrodinâmicas dependem fortemente da viscosidade (η) e da densidade (ρ). Os valores da viscosidade (η) e da densidade (ρ) foram estimados a partir do software Sednterp [47] e nas análises de velocidade de sedimentação foi usado o software SEDFIT (versão 15.01), usando o modelo de distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação (s) [48]. As distribuições dos coeficientes de sedimentação foram obtidas, mantendo o volume parcial específico da partícula (V_{bar}) fixo em 0,733 mL g⁻¹ e deixando a razão friccional f/f_0 como um parâmetro de regularização do ajuste. Além disso, a regularização do método de distribuição usado foi baseada no “método de entropia máxima” com um intervalo de confiança P igual a 0,70. Nesta versão do software SEDFIT os valores dos coeficientes de sedimentação, s , são corrigidos nas condições padrão ($s_{20,w}$), no qual o solvente é a água a 20 °C. Os coeficientes de sedimentação ($s_{20,w}$) de cada espécie presente na solução foram obtidos a partir dos máximos dos picos das curvas $c(s)$.

3.1.3.4 Medidas de DLS

O equipamento da Malvern, modelo Nano Zeta Size com ângulo de espalhamento fixo de 173°, foi utilizado nas medidas de DLS. Este equipamento dispõe de um laser com comprimento de onda de 633 nm.

As amostras da apo-HbGp foram preparadas na ausência e na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl, em tampão fosfato de sódio 10 mmol L⁻¹, em pH 7,0, cujas concentrações foram 0,7 e 1,4 mg mL⁻¹. As amostras, com volume total de 2 mL, foram filtradas em um filtro de poro de 0,45 µm (Millipore, Whatman, USA).

3.1.3.5 Preparação das amostras da Apo-HbGp para as medidas espectroscópicas

Amostras da apo-HbGp foram preparadas numa concentração fixa de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , em pH 7,0 nas medidas de absorção óptica, dicroísmo circular, fluorescência estática e fluorescência resolvida no tempo. Convém mencionar que nas medidas de ultracentrifugação analítica a concentração desse mesmo tampão foi de 50 mmol L^{-1} , enquanto que nas medidas de dicroísmo circular e DLS, a concentração do tampão fosfato utilizada foi de 10 mmol L^{-1} . Também foram preparadas amostras da apo-HbGp na presença da sonda ANS, na faixa de concentração de 0 a $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, amostras da apo-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$) com ureia (0 a $8,0 \text{ mol L}^{-1}$) e ANS ($10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) foram preparadas em condições similares às citadas anteriormente.

3.1.3.6 Parâmetros experimentais utilizados nas medidas espectroscópicas

As medidas de absorção óptica, CD e fluorescência estática foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu 1401C, espectrômetro J-815 da Jasco e espectrofluorímetro da Hitachi Modelo F-4500, respectivamente. Os espectros de absorção óptica foram coletados na faixa de comprimento de onda de 250 a 700 nm. Quanto aos espectros de CD, foram coletados como uma média de quatro varreduras e tempo de resposta de 1 segundo. As medidas de emissão de fluorescência estática foram obtidas com excitação em 295 nm (triptofanos) e 350 nm (ANS), onde as emissões foram monitoradas nas faixas de 305 a 570 nm e de 460 a 600 nm, respectivamente. Fendas de excitação de 2,5 nm e de emissão de 5,0 nm foram utilizadas.

Vale ressaltar que as medidas de fluorescência resolvida no tempo foram feitas no espectrofluorímetro descrito na seção 3.1.2.4. O comprimento de onda do laser foi escolhido a partir dos harmônicos gerados, para obter pulsos de 294 nm para excitar os triptofanos e de 492 nm para excitar a sonda FITC.

3.3 TÉCNICAS DE ESTUDO

3.3.1 Absorção óptica

A teoria quântica é a base para explicar a espectroscopia de absorção UV-visível. A luz tem propriedades características de ondas eletromagnéticas com vários comprimentos de onda, assim como propriedades de partículas chamadas fótons com energias cinéticas precisas [49]. A frequência de radiação eletromagnética está relacionada com a energia pela relação de Einstein abaixo:

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

Onde, h é a constante de Planck igual a $6,63 \times 10^{-34}$ J.s, ν é a frequência da radiação eletromagnética, c é a velocidade da luz no vácuo, λ o comprimento de onda [50]. A energia fornecida pela radiação incidente deve permitir que elétrons em um orbital de uma molécula transitem para um orbital de maior energia, uma vez que, a absorção de fótons pelas moléculas numa solução é muito rápida para o calor escapar da molécula absorvente. A diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado da molécula deve ser precisamente igual à energia do fóton (equação 1) [49].

A Figura 6 apresenta de forma simplificada as transições eletrônicas moleculares que podem ocorrer para uma molécula em solução: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ com diferentes variações de energia [51]. Ambas as transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$ requerem uma energia muito alta e ocorrem na região do ultravioleta distante (150-250 nm). A maioria dos espectros de absorção UV-visíveis envolvem as transições de elétrons n ou π para o orbital π^* , sendo estes orbitais envolvidos nas transições [49].

Figura 6: Diagrama representativo das transições eletrônicas.

Fonte: NILAPWAR, S.J.; NARDELLI, M.; WESTERHOFF, H.V.; VERMA, M. *Methods in Enzymology*, v.500, p. 60-75, 2011 [49].

Na espectroscopia de absorção, a lei de Beer-Lambert relaciona a absorção de luz às propriedades do material no qual a luz incide. Essa lei afirma que a absorbância de um feixe de radiação monocromática colimada em um meio isotrópico homogêneo é proporcional ao caminho ótico de absorção l e à concentração do absorvedor c [49]. A lei de Beer-Lambert pode ser expressa como:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon c l \quad (2)$$

Na qual A é absorbância da amostra, I_0 e I são as intensidades de luz incidente e transmitida, respectivamente. A constante de proporcionalidade ϵ é chamada de coeficiente de absortividade molar, cuja unidade é $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e é determinado no comprimento de onda máximo de absorção, para um determinado solvente.

A espectroscopia de absorção é amplamente utilizada para obter espectros de absorbâncias em função do comprimento de onda de moléculas específicas em solução e em sólidos. Esta técnica tem evoluído como o método preferido para estudos quantitativos e qualitativos, tais como, estimar concentração de proteína em soluções, determinação do coeficiente de absorção molar, estimativa da temperatura de fusão do DNA, determinação do ponto de protonação da molécula (pK), análise de interação biomolecular, cinética enzimática, etc [49,50].

3.3.2 Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo da estrutura e função de macromoléculas em biologia, química, especialmente nas pesquisas de interações de proteínas. A aplicação generalizada de fluorescência no estudo de interações biológicas pode ser explicada por uma combinação de sua alta sensibilidade, facilidade de uso, rapidez, reprodutibilidade e adaptabilidade [52].

A absorção pode promover a molécula para um estado de energia maior S_2 , S_3 ,... ou um nível vibracional de maior energia no estado S_1 num período de tempo da ordem de 10^{-15} s, obedecendo o princípio de Franck Condon. A energia eletrônica dos estados S_2 , S_3 ou o excesso de energia vibracional do estado S_1 é rapidamente perdida por um mecanismo conhecido como conversão interna num tempo da ordem de 10^{-12} s. Uma vez no nível vibracional zero do estado S_1 a molécula pode retornar ao estado fundamental, em ausência de reação fotoquímica, por uma emissão radiativa permitida por spin ($S_1 \rightarrow S_0$) denominada fluorescência ou por conversão interna não radiativa (S_1, S_0) representada na Figura 7 [53]. O espectro de fluorescência está localizado em comprimentos de onda superiores (menor energia) do que o espectro de absorção, devido à perda de energia no estado excitado devido ao relaxamento vibracional [52]. Os processos de decaimento não radioativo que concorrem com a fluorescência são a conversão interna que acontece por colisões com as moléculas do solvente ou por meio da dissipação dos modos vibracionais internos entre níveis de mesma multiplicidade, e o cruzamento intersistema, que ocorre entre estados de diferentes multiplicidades. Vale destacar que todos esses processos citados estão bem representados no diagrama de Jablonski [54].

Como consequência da forte influência do meio circundante na emissão de fluorescência, as moléculas fluorescentes (fluoróforos) são usadas como sondas para a investigação de sistemas físico-químicos, bioquímicos e biológicos. As sondas fluorescentes podem ser divididas em três classes: sondas intrínsecas, sondas extrínsecas ligadas covalentemente e sondas extrínsecas associativas. As sondas intrínsecas são ideais, mas existem apenas alguns exemplos, como triptofanos e tirosinas nas proteínas [55].

É importante salientar que nas medidas de fluorescência estática os processos que influenciam o tempo de permanência da molécula no seu estado excitado não são monitorados

e essas medidas são realizadas sob iluminação contínua. O intervalo de tempo característico para que o processo de emissão de fluorescência ocorra é de 10^{-10} a 10^{-7} segundos [53]. A fluorescência estática fornece uma média temporal da emissão.

Figura 7: Níveis de energia dos elétrons em uma molécula, representados em função de coordenadas nucleares Q . As linhas horizontais correspondem aos níveis vibracionais dos núcleos da molécula. Os números correspondem a: (1) absorção de luz; (2) relaxação da molécula no estado eletrônico excitado; (3) emissão fluorescente; (4) relaxação da molécula no estado eletrônico fundamental.

Fonte: ITO, A.S., BERARDI, M. PAZIN, W.M. Fluorescência e aplicações em Biofísica. São Paulo, Livraria da Física, 2016. 134p.

Por outro lado, nas medidas de fluorescência resolvida no tempo o decaimento da intensidade da emissão em função do tempo é monitorado. Nesse caso a excitação é realizada com luz pulsada, onde a amostra é excitada por um pulso estreito de luz e a largura do pulso é geralmente da ordem de alguns picossegundos [53], o que permite avaliar os processos envolvidos na emissão.

Além disso, muitas amostras podem possuir somente um tipo de molécula fluorescente, mas podem exibir decaimentos bem mais complexos que uma exponencial simples (decaimento mono-exponencial). Por outro lado, se a molécula fluorescente estiver

localizada em diferentes ambientes químicos, pode ocorrer um equilíbrio de espécies, onde, por exemplo, uma delas está exposta ao solvente e a outra protegida, sendo observado um decaimento bi-exponencial. Neste caso, o ajuste dos decaimentos de fluorescência é descrito através de uma soma de exponenciais, relacionada a cada um desses estados que contribuem com diferentes tempos de vida, como mostrado a seguir:

$$I(t) = \sum_i^n \beta_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad (3)$$

No qual τ_i são os tempos de vida do decaimento da fluorescência, β_i indicam as amplitudes das componentes no tempo $t = 0$ e n refere-se ao número de tempos (componentes) do decaimento. A fração de moléculas em cada conformação específica em $t = 0$ corresponde aos fatores pré-exponenciais (β_i).

Para calcular a contribuição relativa (% α) de cada tempo de vida do decaimento, os valores de β_i e τ_i podem ser usados como mostra a seguinte equação:

$$f_i = \frac{\beta_i \tau_i}{\sum_j \beta_j \tau_j} \quad (4)$$

Em geral a análise dos decaimentos no software do equipamento fornece os fatores pré-exponenciais não normalizados. A normalização pode também ser usada como alternativa do cálculo das contribuições individuais dos tempos de vida.

Neste trabalho as medidas de fluorescência resolvida no tempo foram realizadas em um espectrofluorímetro de alta resolução temporal, baseado no método de correlação temporal de fótons únicos, TCSPC (do inglês “Time Correlated Single Photon Counting”). O método consiste na excitação da amostra com pulsos de luz, onde os fótons da excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. Cabe destacar que a fonte de excitação é um laser pulsado *Tsunami 3950* (SpectraPhysics) de titânio-safira (Ti: sapphire) bombeado por laser de estado sólido *MilleniaXs* (SpectraPhysics) [56].

3.3.2.1 Anisotropia de fluorescência

A anisotropia de fluorescência é um fenômeno baseado na existência de momentos de dipolos de transição de absorção e de emissão, que estão alinhados em direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. Esta técnica tem sido muito aplicada em estudos bioquímicos, uma vez que fornece informações sobre tamanho, forma e localização de proteínas [54]. Numa solução homogênea os fluoróforos encontram-se orientados randomicamente, porém, quando excitados com luz polarizada, os fluoróforos que apresentarem momentos de dipolo de transição de absorção dispostos paralelamente ao vetor campo elétrico de excitação são preferencialmente excitados. Dentre os diversos fatores que causam despolarização o mais comum é a difusão rotacional dos fluoróforos. As medidas de anisotropia de fluorescência permitem obter informações sobre o deslocamento angular médio (ω) do fluoróforo entre a absorção e a subsequente emissão de um fóton, e este deslocamento angular depende da extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida médio do estado excitado. Por conseguinte, os movimentos de rotação dependem da viscosidade do solvente e do tamanho das moléculas que sofrem difusão rotacional [54].

Convém mencionar que depois que a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente, o polarizador mede a intensidade de emissão. Quando o polarizador está orientado paralelamente à polarização da excitação, a intensidade é representada como I_{VV} , enquanto que se estiver orientado perpendicularmente à excitação a intensidade é I_{VH} . Estes valores são necessários para estimar o valor da anisotropia de fluorescência que é dado pela equação abaixo [54]:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (5)$$

No qual I_{VV} refere-se à intensidade de uma excitação e emissão verticalmente polarizadas, I_{VH} corresponde a intensidade de uma excitação verticalmente polarizada e uma emissão horizontalmente polarizada. O fator G está relacionado com a sensibilidade do sistema que detecta a luz polarizada e é calculado a partir de:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (6)$$

Onde as intensidades I_{HV} e I_{HH} são medidas com a excitação horizontalmente polarizada.

Esta técnica permite o estudo do movimento dos fluoróforos e tem sido bastante aplicada em pesquisas na área de bioquímica, uma vez que a escala de tempo da difusão rotacional das biomoléculas é comparável ao tempo de decaimento de muitos fluoróforos [54]. Neste trabalho esta técnica foi utilizada para estudar o processo de desnaturação da proteína, bem como, a associação desta macromolécula com a sonda FITC.

3.3.2.2 Decaimento de anisotropia de fluorescência

O decaimento de anisotropia de fluorescência é calculado pela medida do decaimento da fluorescência das componentes de emissão polarizadas paralelamente $I_{\parallel}(t)$ e perpendicularmente $I_{\perp}(t)$ à polarização de excitação. A equação que descreve o decaimento de anisotropia resulta da diferença entre $I_{\parallel}(t)$ e $I_{\perp}(t)$, normalizada pela intensidade total de emissão de luz:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (7)$$

O comportamento do decaimento de anisotropia depende do tamanho, forma e do ambiente local do fluoróforo [54]. Por exemplo, se a molécula é esférica observa-se um único tempo de correlação rotacional (θ) e a dependência temporal da anisotropia é mono-exponencial:

$$r(t) = r_0 \exp(-t/\theta) \quad (8)$$

Na qual r_0 é a anisotropia no tempo $t = 0$ e θ é o tempo de correlação rotacional do fluoróforo.

Por outro lado, se o fluoróforo não é esférico, verificam-se decaimentos multi-exponenciais para a anisotropia. Neste caso, os tempos de correlação são definidos através das taxas de rotação em torno dos vários eixos da molécula.

$$r(t) = \sum_j r_{0j} \exp(-t/\theta_j) \quad (9)$$

Convém mencionar que as medidas de decaimento de anisotropia desse trabalho foram obtidas por um espectrofluorímetro de alta resolução temporal baseando na técnica de TCSPC, onde o fluoróforo é excitado com um pulso de luz polarizada. Sendo assim, o equipamento que foi utilizado é o mesmo descrito na técnica de fluorescência resolvida no tempo disponível no Laboratório de Fotobiofísica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto.

3.3.3 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)

Partículas em uma dispersão coloidal espalham quando interagem com a luz de um laser incidente e a intensidade da luz espalhada é quantificada no equipamento de DLS (do inglês “Dynamic Light Scattering”) [57]. As partículas continuamente móveis dentro da dispersão causam interferências construtivas e destrutivas e, portanto, a intensidade de luz difusa flutua ao longo do tempo (Figura 4A). Característica desse movimento Browniano das partículas é que pequenas moléculas se movem mais rápido do que as grandes. No DLS a intensidade de flutuação da luz dispersa é correlacionada com intervalos de tempo curtos (T) e a função de autocorrelação (Figura 4B) é obtida da equação mono-exponencial (equação 10) para amostras com partículas totalmente monodispersas [57].

$$G(T) = 1 + b \cdot e^{-2Dq^2T} \quad (10)$$

na qual b é uma constante dependente do instrumento e das configurações ópticas, D é o coeficiente de difusão translacional e q é o vetor de espalhamento.

Figura 8: (A) Flutuações na intensidade de luz espalhada devido a interferências construtivas e destrutivas. (B) Função de autocorrelação (correlograma) gerado pelo software para estimar o R_h [57].

Fonte: BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. V.235, p.337-352, 2016.

Vale destacar que para amostras compostas por uma única população de partículas, duas características podem ser extraídas do coeficiente de difusão translacional (D). Primeiro, o tamanho médio das partículas hidrodinâmicas pode ser calculado assumindo uma geometria simples, como a de uma esfera, e usando a equação de Stokes-Einstein (equação 11). Segundo, a polidispersão da população das partículas é dada pelo desvio padrão do coeficiente de difusão D [58].

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (11)$$

na qual k representa a constante de Boltzman ($1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$), η a viscosidade do solvente, R_h o raio hidrodinâmico da partícula e T é a temperatura absoluta [59]. O coeficiente de difusão translacional dependerá não apenas do tamanho da partícula, mas também da estrutura da superfície, bem como, da concentração e tipos de íons no meio. No caso das proteínas vários fatores influenciam os tamanhos hidrodinâmicos proteicos: a massa molecular, a forma da conformação da molécula, se a proteína está em seu estado nativo ou estado desenovelado, o que afeta o tamanho e a forma da macromolécula [59].

A espectroscopia de correlação de fótons baseada na dispersão de luz tornou-se uma poderosa técnica, para estudar as propriedades de suspensões, coloides, soluções biológicas,

macromoléculas e polímeros, porque é absoluta, não invasiva e não destrutiva [59]. A técnica também é útil para medir a velocidade, por exemplo, de micro-organismos que flutuam na solução, ou para analisar o fluxo em fluidos. Além disso, é muito sensível à presença de agregados, o que é extremamente importante para a grande maioria das aplicações farmacêuticas e biomoleculares [59].

3.3.4 Ultracentrifugação Analítica (AUC)

Desenvolvida em 1920 por Svedberg, e redesenhada em um instrumento comercial por Edward Pickelsem 1990, a ultracentrifugação analítica tornou-se a técnica central no desenvolvimento da bioquímica e biologia molecular [60]. É uma técnica clássica para estudar partículas suspensas na faixa de tamanho de pequenos íons monoatômicos a organismos unicelulares. Dependendo do sistema, pode dar informações sobre densidade, composição, massa e forma das partículas. Além disso, pode ser usada para caracterizar interações com os solventes, estequiometria de ligação macromolecular, afinidade de ligação e cinética, composição de complexos multiproteicos reversíveis e pode revelar mudanças conformacionais induzidas pelo ligante em macromoléculas.

Devido a esse rico potencial de caracterização macromolecular, a ultracentrifugação analítica tem um papel fundamental no desenvolvimento da bioquímica física e biologia molecular como foi mencionado anteriormente, mas possui também aplicações significativas em outras áreas, tais como: biologia genômica, química de polímeros, química supramolecular, nanopartículas, biomateriais e biotecnologia [61]. É considerada uma técnica versátil, uma vez que a teoria, instrumentação e aplicações vêm sendo continuamente desenvolvidas até o presente momento. De maneira particular, tem se observado um aumento considerável no número de diferentes tipos de aplicações, coincidindo com abordagens computacionais mais poderosas [62]. Esta combinação de uma nova instrumentação e um software poderoso para analisar os dados tem levado a um grande avanço na caracterização de proteínas e complexos proteicos [60].

Essa técnica se baseia em teorias bem fundamentadas da física de movimentos. Quando uma molécula em solução é mantida em um rotor girando rapidamente, pode-se afirmar que existem três forças agindo sobre ela. Como o rotor gira com uma velocidade angular ω (radianos por segundo), a molécula é sujeita a migrar para o fundo do tubo pela

força centrífuga que é proporcional ao produto de sua massa (m) e a distância (r) do centro de rotação $F_c = \omega^2 \cdot r \cdot m$. Ao mesmo tempo, atua também uma força oposta que é a força de empuxo (F_{Emp}), gerada pelo peso do fluido deslocado, e essa força depende unicamente da densidade do fluido (ρ_f) e do volume do objeto em função da massa. A terceira força que atua sobre a molécula é à força de atrito (F_f) que está relacionada ao formato da partícula e depende tanto do coeficiente friccional f como da velocidade da partícula v . Assim, a molécula, que estava inicialmente em repouso, adquire uma velocidade constante suficientemente grande fazendo com que estas forças se anulem [63].

$$F_c + F_{emp} + F_f = \omega^2 r m + (-\omega^2 r m V_{bar} \rho_f) + (-fv) = 0 \quad (12)$$

Onde, V_{bar} é o volume parcial específico de uma partícula.

A equação 12 pode ser rearranjada em função da velocidade:

$$v = \frac{|\omega^2 r m (1 - V_{bar} \rho_f)|}{f} \quad (13)$$

A partir dessa equação 11 se substituirmos a massa por $m = \frac{MM}{N_{Av}}$ onde MM é a massa molecular e N_{Av} é o número de Avogadro, chegaremos à equação de Svedberg:

$$\frac{MM (1 - V_{bar} \rho_f)}{N_{Av} f} = \frac{v}{\omega^2 r} \equiv S \quad (14)$$

A velocidade dividida pela força de campo centrífuga é denominada de coeficiente de sedimentação “S”, a unidade de s é segundo, mas como são comumente encontrados experimentalmente aproximadamente 10^{-13} segundos, a quantidade 1×10^{-13} equivale a 1 Svedberg (S) em homenagem ao precursor nas análises da técnica, Theodor Svedberg [63].

A partir desta técnica dois métodos são aplicados: velocidade de sedimentação e sedimentação em equilíbrio. O método de velocidade de sedimentação usa geralmente uma velocidade alta do rotor, tipicamente 40.000 rpm ou acima. Nessa velocidade a grande maioria das proteínas sedimentará no fundo da célula da amostra. Este simples processo é

altamente rico em informações, uma vez que a sedimentação depende do tamanho e forma da proteína. Assim, uma proteína de 50 kDa pode sedimentar mais lentamente do que uma proteína de 40 kDa, devido à proteína mais pesada ser altamente alongada [60]. Por outro lado, os experimentos de equilíbrio de sedimentação são conduzidos em velocidades mais baixas do rotor, sendo possível obter informações sobre a massa molecular independentemente da forma da partícula [63].

3.3.5 Dicroísmo circular

A presença de diferentes estruturas secundárias como, por exemplo, hélices α e/ou estruturas folhas β , representa uma característica muito comum das proteínas, e contribui para a função biológica. O reconhecimento de tais estruturas em proteínas, a sua quantidade e as mudanças estruturais que ocorrem no meio em que se encontram, constituem um fator muito importante para a compreensão da forma como essas moléculas se organizam na estrutura nativa e, conseqüentemente, exercem sua função biológica [64].

Em vista disso, a técnica de dicroísmo circular (CD) é amplamente usada para estimar a quantidade de estrutura secundária das proteínas, avaliar e detectar alterações conformacionais ocasionadas pela adição de ligantes ou agentes desnaturantes (ureia, cloridrato de guanidina, surfactantes), variação de temperatura e de pH do meio [65].

Devido à possibilidade de explorar a estrutura da proteína sob uma grande variedade de condições experimentais e poder ser usada para avaliar as velocidades em que as mudanças estruturais ocorrem, pode-se afirmar que o CD é uma técnica bastante versátil [65].

Em proteínas, os cromóforos de interesse incluem a ligação peptídica (absorção abaixo de 240 nm), aminoácidos aromáticos (absorção na faixa de 260 nm a 320 nm) e pontes dissulfeto (bandas largas de absorção pouco intensas em torno de 260 nm). Além disso, cofatores não proteicos podem absorver em mais de uma faixa espectral, incluindo os grupos heme que tem absorção intensa em torno de 410 nm, e outras bandas no intervalo de 350 nm a 650 nm (dependendo do estado de spin e coordenação ao átomo de Fe central).

Vale ressaltar ainda que as bandas de CD para a maioria das proteínas ocorrem em duas regiões espectrais. A região do UV distante (180 a 250 nm) que é dominada pelas

contribuições das ligações peptídicas, e a região do UV próximo (250 a 320 nm) que é originada principalmente pelas contribuições dos aminoácidos aromáticos.

Uma característica essencial no interesse do uso da espectropolarimetria de dicroísmo circular é que requer baixas concentrações de amostras na região do UV distante (1 a 10 mgmL^{-1}), permitindo o estudo de mudanças provocadas por um número considerável de variáveis, tais como temperatura, pH, efeito de ligantes adicionados, dentre outras[66].

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

PARTE I

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DA HEMOGLOBINA
EXTRACELULAR GIGANTE DE *GLOSSOSCOLEX*
PAULISTUS (HbGp) MODIFICADA PELA Sonda DE
FLUORESCÊNCIA
FLUORESCÉINA ISOTIOCIANATO (FITC)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DA HbGp MODIFICADA PELA SONDA DE FLUORESCÊNCIA FITC.

4.1.1 Efeitos das diferentes concentrações de ureia na oxi-HbGp modificada com FITC

4.1.1.1 Dados de absorção óptica

Os espectros de absorção óptica da oxi-HbGp modificada pela sonda FITC, em pH 7,0, em função da concentração de ureia são mostrados na Figura 9A. A Figura 9B apresenta a absorbância em 415 nm (Banda de Soret) e o comprimento de onda de absorção desta banda, em função da concentração de ureia. A partir dos espectros observa-se que até 4,0 mol L⁻¹ de ureia não ocorrem mudanças significativas, indicando que até esta concentração a oxidação do ferro do grupo heme não ocorre. Em concentrações maiores de ureia percebe-se um alargamento e redução na intensidade da banda de Soret [22]. Além disso, observa-se um deslocamento desta banda para o azul, podendo ser atribuído à oxidação do ferro e formação de novas espécies em solução, por exemplo, aquo-meta e hemicromo [67]. Vale salientar que efeitos semelhantes foram observados com o agente desnaturante cloridrato de guanidina (GuHCl), contudo esses efeitos ocorreram em concentrações menores desse agente caotrópico [68].

Figura 9: (A) Espectros de absorção óptica da oxi-HbGp ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) modificada pela sonda FITC, na presença de diferentes concentrações de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0. (B) Gráficos da absorbância na banda de Soret (415 nm), representado pelos quadrados vermelhos, e do comprimento de onda no máximo da banda de Soret, representado pelos círculos azuis, em função da concentração de ureia.

Fonte: BARROS, A.E.B., BARIONI, M.B., CARVALHO, F.A.O., ITO, A.S., TABAK, M. *Glossoscolex paulistushemoglobin with fluorescein isothiocyanate: Steady-state and time-resolved fluorescence*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.98, p. 777–785, 2017 [37].

4.1.1.2 Dados de fluorescência estática

A Figura 10A mostra os espectros de emissão de fluorescência da oxi-HbGp marcada com FITC ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$), na presença de ureia, na faixa de concentração de 0 a 8 mol L^{-1} , com excitação em 295 nm. O pico centrado em 330-350 nm (pico I) corresponde à emissão dos triptofanos, enquanto que o pico II, centrado em torno de 520 nm, corresponde à emissão da sonda FITC. Estes espectros permanecem constantes até $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ureia, porém, em

2,5 mol L⁻¹ observa-se uma primeira transição monitorada tanto pelos triptofanos como pela sonda FITC. As áreas dos espectros de emissão de fluorescência, normalizadas para o valor da área na ausência de ureia, dos triptofanos (pico I) e da sonda FITC (pico II), em função da concentração de ureia, são mostradas na Figura 10B. Na primeira transição, na faixa de concentração de 2,5 a 5,0 mol L⁻¹, verifica-se que ocorre um aumento na emissão da sonda (por um fator em torno de 5), enquanto o aumento na emissão dos triptofanos foi em torno de 8 vezes quando comparado ao valor na ausência de desnaturante. Além disso, acima de 5,0 mol L⁻¹, nota-se que a emissão dos triptofanos (pico I) aumentou significativamente em torno de 18 vezes (Figura 10B), devido ao desenovelamento da proteína. Convém mencionar que este aumento na emissão dos triptofanos da oxi-HbGp, modificada com FITC na presença de ureia, é idêntico ao aumento observado em estudos prévios da oxi-HbGp nativa também na presença deste desnaturante [22]. Por outro lado, o aumento verificado na emissão de fluorescência da sonda FITC, acima de 5,0 mol L⁻¹ de ureia, é muito inferior, em torno de 6 vezes em altas concentrações de desnaturante.

Os gráficos do deslocamento do máximo de emissão referente ao pico I (triptofanos) e do espalhamento de luz medido no espectrofluorímetro (LSI em 350 nm) são mostrados na Figura 10C. Com base nesses gráficos, percebe-se um considerável deslocamento do máximo de emissão dos triptofanos para o vermelho, de 331 para 349 nm. Este expressivo aumento de emissão e deslocamento batocrômico sugere que, provavelmente, ocorrem, respectivamente, uma redução de transferência de energia dos triptofanos para os grupos hemes e uma maior exposição dos triptofanos ao solvente [22,44]. Além disso, observa-se um decréscimo na intensidade de luz espalhada (LSI, Figura 10C) à medida que aumenta a concentração de ureia. Este resultado, possivelmente, está associado ao aumento de espécies de baixo peso molecular em solução devido à dissociação oligomérica da oxi-HbGp na presença do desnaturante.

Figura 10: (A) Espectros de emissão de fluorescência da oxi-HbGp ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) marcada com FITC, na presença de diferentes concentrações de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0 com excitação em 295 nm . (B) Gráficos das áreas referentes ao pico I e ao pico II, normalizadas em relação à concentração de $0,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia, em função da concentração do desnaturante. (C) Gráficos da variação do comprimento de onda de emissão de fluorescência do pico I e espalhamento de luz medido no fluorímetro, em função da concentração de ureia.

Fonte: BARROS, A.E.B., BARIONI, M.B., CARVALHO, F.A.O., ITO, A.S., TABAK, M. *Glossoscolex paulistushemoglobin with fluorescein isothiocyanate: Steady-state and time-resolved fluorescence*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.98, p. 777–785, 2017 [37].

Os espectros de emissão de fluorescência de FITC ligada a oxi-HbGp, na ausência e na presença de diferentes concentrações de ureia, com excitação em 480 nm , são mostrados na Figura 11A. A partir desses espectros observa-se que aumentando a concentração de ureia ocorre um aumento na intensidade de emissão de fluorescência, sendo este aumento semelhante ao observado com excitação em 295 nm (pico II). Verificou-se que, até $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ureia, a intensidade da emissão permanece constante, mas entre $1,5$ e $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ de desnaturante uma transição evidente é observada. Entre $5,0$ e $8,0 \text{ mol L}^{-1}$, apenas pequenas mudanças são observadas, consistentes com mudanças menores no ambiente de FITC ligada a

proteína. A Figura 11B compara o aumento da área do espectro de emissão de fluorescência de FITC ligada a HbGp com excitação em 295 nm e 480 nm, sendo os dois gráficos muito similares. O aumento na intensidade de emissão da sonda ligada à proteína é atribuído à remoção da supressão promovida pela dissociação oligomérica da oxi-HbGp. Além disso, pode ser atribuído também à remoção das interações hidrofóbicas que estabilizam as estruturas das proteínas globulares [69].

Figura 11: (A) Espectros de emissão de fluorescência da oxi-HbGp modificada por FITC ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$), na presença de diferentes concentrações de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0 com excitação em 480 nm. (B) Gráficos das áreas, referentes ao pico II da Figura 10A (exc 295 nm) e da Figura 11A (exc 480 nm) normalizadas a partir da concentração de $0,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia, em função da concentração de desnaturante.

Fonte: BARROS, A.E.B., BARIONI, M.B., CARVALHO, F.A.O., ITO A.S., TABAK, M. *Glossoscolex paulistushemoglobin with fluorescein isothiocyanate: Steady-state and time-resolved fluorescence*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.98, p. 777–785, 2017 [37].

4.1.1.3 Dados de fluorescência resolvida no tempo

Os experimentos de fluorescência resolvida no tempo foram realizados utilizando dois comprimentos de onda de excitação: 294 nm (triptofanos) e 492 nm (FITC). A emissão foi monitorada também em dois comprimentos de onda, 340 e 515 nm, para triptofanos e FITC, respectivamente. As Tabelas 2 a 4 mostram os resultados obtidos desses experimentos com os parâmetros dos decaimentos de fluorescência, tais como: tempos de vida de fluorescência (τ_i em ns), as contribuições percentuais (α_i em %) e os coeficientes pré-exponenciais (β_i), para cada componente ($i=1$ a 4). Em geral, os decaimentos são multi-exponenciais, sendo que para os triptofanos foram obtidos quatro tempos de vida, dois na faixa de picossegundos e os outros dois da ordem de nanossegundos (Tabelas 2 e 3). Os decaimentos da sonda FITC ligada à proteína são também multi-exponenciais, com três tempos de vida (Tabela 4). Vale salientar que uma apresentação mais detalhada dos resultados dos decaimentos tanto para os triptofanos quanto para a sonda FITC é mostrada na sequência.

4.1.1.3.1 Emissão dos triptofanos da HbGp

Os resultados apresentados na Tabela 2 são referentes aos ajustes das curvas de decaimento de fluorescência da oxi-HbGp nativa ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$), na ausência e na presença de diferentes concentrações de ureia.

Tabela 2: Parâmetros obtidos por fluorescência resolvida no tempo para a oxi-HbGp nativa ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) em tampão fosfato 30 mmol L^{-1} , pH 7,0, em diferentes concentrações de ureia, $\lambda_{\text{ex}} = 294 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$.

Parâmetros	[Ureia] mol L ⁻¹				
	0	1	2,5	3,5	6,0
τ_1 (ns)	$0,030 \pm 0,001$	$0,031 \pm 0,001$	$0,036 \pm 0,001$	$0,046 \pm 0,002$	$0,083 \pm 0,003$
α_1 (%)	56,5	55,4	31,0	14,1	9,2
β_1	$0,42 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,06$	$0,156 \pm 0,002$
β_1^*	0,96	0,95	0,92	0,85	0,68
τ_2	$0,27 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,02$	$0,59 \pm 0,03$
α_2	21,5	20,2	15,3	12,6	16,4
β_2	$0,017 \pm 0,001$	$0,018 \pm 0,001$	$0,021 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,01$	$0,039 \pm 0,001$
β_2^*	0,039	0,04	0,06	0,085	0,17
τ_3	$1,4 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	$1,52 \pm 0,08$	$1,50 \pm 0,06$	$2,1 \pm 0,1$
α_3	12,1	10,8	20,5	25,8	36,1
β_3	$0,002 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,001$	$0,013 \pm 0,001$	$0,024 \pm 0,001$
β_3^*	0,004	0,005	0,013	0,038	0,104
τ_4	$4,4 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,1$	$4,85 \pm 0,06$	$4,9 \pm 0,1$
α_4	9,9	13,5	33,2	47,5	38,4
β_4	0	$0,001 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,001$	$0,011 \pm 0,001$
β_4^*	0,000	0,002	0,008	0,023	0,048
$\langle \tau \rangle$ (ns)	0,277	0,689	2,11	2,72	2,74
χ^2 reduzido	1,497	1,419	1,147	1,092	1,063

* Coeficientes pré-exponenciais normalizados

Na Figura 12 os decaimentos de fluorescência da oxi-HbGp pura (Figura 12A) e da oxi-HbGp marcada com FITC (Figura 12B) são mostrados juntamente com os respectivos melhores ajustes. Convém mencionar que um decaimento multi-exponencial com quatro tempos de vida foi observado também, num estudo prévio, para a hemoglobina gigante de *Lumbricus terrestris* (HbLt) [70].

Figura 12: Decaimentos da intensidade de fluorescência da oxi-HbGp pura (A) e da oxi-HbGp marcada com FITC (B) na razão sonda/heme de 1:5, na presença de diferentes concentrações indicadas de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0. λ_{ex} = 294 nm e λ_{em} = 340 nm, e os respectivos pulsos de excitação.

ITO A.S.,TABAK, M. *Glossoscolex paulistushemoglobin with fluorescein isothiocyanate: Steady-state and time-resolved fluorescence.* **Int. J. Biol. Macromol**, v.98, p. 777–785, 2017 [37].

Tabela 3: Parâmetros obtidos por fluorescência resolvida no tempo para a oxi-HbGp marcada com FITC (0,1 mg mL⁻¹) na razão sonda/heme de 1:5, em tampão fosfato 30 mmol L⁻¹, pH 7,0, em diferentes concentrações de ureia, $\lambda_{\text{ex}} = 294$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm.

Parâmetros	[Ureia] mol L ⁻¹				
	0	1	2,5	3,5	6,0
τ_1 (ns)	0,03 ± 0,01	0,028 ± 0,001	0,043 ± 0,001	0,064 ± 0,002	0,084 ± 0,004
α_1 (%)	55,4	53,4	34,0	15,7	9,8
β_1	0,44 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,02
β_1^*	0,9628	0,9554	0,93	0,805	0,693
τ_2	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,31 ± 0,002	0,44 ± 0,02	0,66 ± 0,03
α_2	15,3	17,0	13,5	15,4	18,6
β_2	0,014 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,020 ± 0,002	0,03 ± 0,01	0,039 ± 0,001
β_2^*	0,0311	0,0361	0,05	0,115	0,169
τ_3	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,3 ± 0,1
α_3	11,7	13,7	21,7	28,8	40,5
β_3	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,024 ± 0,001
β_3^*	0,004	0,0064	0,015	0,054	0,104
τ_4	4,1 ± 0,3	4,5 ± 0,4	4,8 ± 0,2	4,8 ± 0,1	5,2 ± 0,2
α_4	17,6	15,9	30,8	40,0	31,0
β_4	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,008 ± 0,001
β_4^*	0,002	0,0021	0,007	0,027	0,035
$\langle \tau \rangle$ (ns)	0,92	1,063	1,90	2,49	2,65
χ^2 reduzido	1,488	1,337	1,120	1,0	1,0

* Coeficientes pré-exponenciais normalizados

Com base nos resultados mostrados nas Tabelas 2 e 3, observa-se que, na ausência de ureia (0 mol L⁻¹), as contribuições percentuais dos dois tempos curtos de 0,03 e 0,27 ns correspondem a um total de aproximadamente 80% do total da intensidade de fluorescência. Estas contribuições percentuais, α_1 e α_2 , são reduzidas na presença da ureia com um aumento simultâneo das contribuições dos tempos longos α_3 e α_4 . Os valores dos tempos de vida permanecem essencialmente constantes até 3,5 mol L⁻¹ de ureia, porém, em 6,0 mol L⁻¹ de desnaturante aumentam significativamente. Na faixa de concentração de ureia entre 0,0 a 2,5 mol L⁻¹, como mencionado anteriormente, as maiores contribuições são atribuídas aos tempos de vida curtos. Estes resultados sugerem que uma intensa supressão de fluorescência dos triptofanos ocorre, sendo promovida, provavelmente, pelos grupos hemes da proteína. No entanto, em 6,0 mol L⁻¹ de ureia, esta supressão de fluorescência é diminuída com aumento concomitante nos valores de tempos de vida longos e suas respectivas contribuições percentuais. Estes resultados indicam que está ocorrendo uma diminuição na supressão da

emissão dos triptofanos, bem como, uma maior exposição dos triptofanos para o solvente na interface da proteína, uma vez que em concentrações maiores do agente desnaturante a proteína encontra-se dissociada em subunidades menores, o que remove a supressão promovida pelos grupos hemes de subunidades vizinhas.

A Tabela 3 mostra os parâmetros dos decaimentos de triptofanos apresentados na Figura 12B da oxi-HbGp marcada com FITC, na presença e na ausência de ureia. O comportamento observado para oxi-HbGp nativa (Figura 12A e Tabela 2) é mantido para o sistema oxi-HbGp-FITC. Foram observados também decaimentos multi-exponenciais (Figura 12B e Tabela 3) com quatro tempos de vida para os triptofanos da oxi-HbGp quando marcada com FITC, e os efeitos da adição de ureia são também similares aos observados para oxi-HbGp nativa (Figura 12A e Tabela 2). Portanto, esses resultados sugerem que, aparentemente, a reação de marcação da HbGp com FITC não provoca mudanças significativas na estrutura terciária da proteína, e nos decaimentos de fluorescência dos triptofanos.

4.1.1.3.2 Emissão da sonda FITC ligada a oxi-HbGp

Os tempos de vida da sonda FITC pura em tampão e da sonda ligada à oxi-HbGp, na ausência e na presença de ureia, são mostrados na Tabela 4. A primeira medida controle foi realizada para a sonda FITC em tampão fosfato 30 mmol L⁻¹, pH 7,0. Foi observado um decaimento bi-exponencial, com tempos de vida de 3,9 ns e 1,3 ns, cujas contribuições percentuais correspondentes são de 90% e 10%, respectivamente. O tempo mais longo de 3,9 ns, está associado à emissão da sonda livre em solução e é consistente com o valor descrito na literatura [27]. Por outro lado, FITC ligada a oxi-HbGp apresenta um decaimento multi-exponencial, com três tempos de vida. O aumento da concentração de ureia resulta no aumento das contribuições percentuais dos tempos de vida mais longos, sendo observado nas concentrações de 3,5 e 6,0 mol L⁻¹ de ureia uma contribuição do tempo de vida de 3,9 ns de 91 a 92%. Este comportamento pode ser atribuído à diminuição de supressão da emissão de fluorescência de FITC e a uma maior exposição desta sonda ao solvente, associado à dissociação oligomérica e ao desenovelamento da HbGp em altas concentrações de ureia. Além disso, esse resultado sugere que FITC liga-se à proteína num sítio que se torna muito acessível ao solvente após a dissociação oligomérica.

Tabela 4: Parâmetros obtidos por fluorescência resolvida no tempo para FITC pura e para FITC ligada a oxi-HbGp (0,1 mg mL⁻¹) na razão sonda/heme de 1:5, em tampão fosfato 30 mmol L⁻¹, pH 7,0, em diferentes concentrações de ureia. $\lambda_{\text{ex}} = 492$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 515$ nm.

Parâmetros	[Ureia] mol L ⁻¹					
	•	0	1	2,5	3,5	6,0
τ_1 (ns)	1,28±0,02	0,099 ± 0,002	0,093± 0,002	0,102 ± 0,003	0,102 ± 0,007	0,092 ± 0,007
α_1 (%)	10,5	19,9	16,5	6,8	2,5	1,1
β_1	0,021±0,0002	0,037 ± 0,002	0,137± 0,002	0,099 ± 0,002	0,026 ± 0,002	0,064 ± 0,001
β_1^*	0,2625	0,792	0,787	0,66	0,456	0,429
τ_2	3,94±0,01	0,601 ± 0,010	0,62 ± 0,01	0,83 ± 0,02	1,16 ± 0,08	1,58 ± 0,08
α_2	89,5	22,7	19,5	10,3	6,2	6,4
β_2	0,059±0,0003	0,026±0,001	0,024±0,001	0,019±0,001	0,006±0,001	0,011±0,004
β_2^*	0,7375	0,150	0,138	0,127	0,105	0,143
τ_3	-	3,80 ± 0,01	3,83 ± 0,01	3,85 ± 0,01	3,89 ± 0,01	3,88 ± 0,01
α_3	-	57,4	64,0	82,8	91,3	92,5
β_3	-	0,010±0,001	0,013±0,001	0,032±0,001	0,025±0,001	0,033±0,003
β_3^*	-	0,058	0,075	0,213	0,439	0,429
$\langle \tau \rangle$ (ns)	3,66	2,31	2,60	3,28	3,62	3,68
χ^2 reduzido	1,117	1,198	1,146	1,124	1,015	1,063

- Amostra de FITC pura em tampão fosfato de sódio
- *Coeficientes pré-exponenciais normalizados

4.1.1.4 Dados de anisotropia de fluorescência

4.1.1.4.1 Dados de anisotropia de fluorescência estática da sonda FITC ligada à proteína

Na Figura 13 são mostrados os dados de anisotropia de fluorescência, para a sonda FITC ligada à proteína, em função da concentração de ureia, medidos num espectrofluorímetro comprimento de onda de excitação de 480 nm e emissão em 515 nm. O valor de anisotropia (r), na ausência de ureia, é em torno de 0,1. Até 2,0 mol L⁻¹ de desnaturante os valores de anisotropia não apresentam mudanças significativas. Porém, aumentando a concentração de ureia em torno de 3 mol L⁻¹ de desnaturante o valor de anisotropia (r) aumenta para 0,14, mas este aumento é visualizado somente até 4,5 mol L⁻¹ de

desnaturante. A partir de $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ o valor de anisotropia volta a diminuir para 0,1, mesmo valor observado na ausência de ureia. É importante destacar que o máximo valor de anisotropia observado em $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ureia corresponde ao meio da transição observada na Figura 10B condizente com a dissociação oligomérica da oxi-HbGp. Na segunda transição, em altas concentrações de ureia onde a proteína encontra-se desenovelada, nota-se um decréscimo nos valores de anisotropia.

Figura 13: Anisotropia de fluorescência do estado estacionário de FITC ligada à proteína.

Fonte: BARROS, A.E.B., BARIONI, M.B., CARVALHO, F.A.O., ITO A.S., TABAK, M. *Glossoscolex paulistushemoglobin with fluorescein isothiocyanate: Steady-state and time-resolved fluorescence*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.98, p. 777–785, 2017 [37].

4.1.1.4.2 Dados de anisotropia resolvida no tempo da sonda FITC ligada à proteína

O decaimento de anisotropia de FITC pura em tampão fosfato de sódio é caracterizado por um único tempo de correlação rotacional θ de 0,19 ns e uma anisotropia inicial (r_0) de 0,265 (Figura 14 e Tabela 5). Entretanto, para FITC ligada a oxi-HbGp na ausência de ureia foi obtido um decaimento de anisotropia bi-exponencial com dois tempos de correlação

rotacional, de 0,37 e 1,8 ns (Figura 14A e Tabela 5). Os tempos de correlação rotacional θ_1 e θ_2 , curto e longo, respectivamente, estão relacionados, provavelmente, ao movimento residual da sonda em relação à proteína. Isto ocorre certamente devido ao fato de que as moléculas de FITC estão ligadas a aminoácidos do N-terminal de parte das subunidades da proteína e mantêm um considerável grau de movimento reorientacional relativo à proteína. Na Figura 14A são mostrados os decaimentos de anisotropia de FITC pura em tampão fosfato de sódio e da FITC ligada a oxi-HbGp, na ausência de desnaturante, e na Figura 14B da FITC ligada à proteína, na presença de 1,0 e 6,0 mol L⁻¹ de ureia. A partir dos dados mostrados na Tabela 5 é interessante destacar que o aumento da concentração de desnaturante não produz variações consideráveis no movimento rotacional da sonda ligada à proteína. Ambos os tempos de correlação rotacional permanecem praticamente constantes, apresentando valores médios de 0,36 e 2,4 ns, em todas as concentrações de ureia. No entanto, a contribuição do tempo de correlação rotacional mais longo para a emissão total aumenta de 20 a 35% com o aumento da concentração de desnaturante.

O comportamento da anisotropia é complexo e vários processos ocorrem simultaneamente. Poderíamos esperar uma anisotropia estacionária grande para o sistema HbGp-FITC, na ausência de ureia. Além disso, vale ressaltar que a anisotropia estática resulta do valor médio do decaimento de anisotropia calculado durante o decaimento de intensidade de fluorescência. Se o decaimento do estado excitado é muito rápido, não existirá tempo suficiente para a despolarização ocorrer e a anisotropia tende a valores altos. Contudo, o valor medido da anisotropia estática para o sistema HbGp-FITC é em torno de 0,10. Isto se deve, provavelmente, à alta mobilidade reorientacional da sonda FITC ligada a aminoácidos do N-terminal das subunidades da proteína. Convém mencionar que a ligação de FITC a BSA tem sido descrita na literatura e, diferentemente da HbGp, um alto valor de tempo de correlação rotacional foi estimado para o sistema BSA-FITC [71]. Entretanto, neste caso FITC é covalentemente ligada ao grupo sulfidril na estrutura da BSA, inibindo a reorientação do fluoróforo relativo à proteína. Os resultados do sistema HbGp-FITC apresentados sugerem que a HbGp não possui nenhum grupo reativo sulfidril disponível para ligar o fluoróforo. No processo de desnaturação promovido pela ureia, a predominância dos componentes dos tempos de vida longos no decaimento da intensidade de emissão possibilita um movimento rotacional dos fluoróforos maior, ainda no estado excitado, o que leva à diminuição da anisotropia de fluorescência.

Uma última questão digna de nota é qual seria o tempo de correlação rotacional esperado para a proteína. Considerando a equação de Debye para o cálculo desse tempo: $\theta_c = \eta \cdot V_h / k \cdot T$, na qual η é a viscosidade da solução, V_h é o volume hidrodinâmico da partícula (proteína), k é a constante de Boltzman e T a temperatura absoluta. Considerando que a HbGp é uma esfera de raio 14 nm, baseado no diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS [18], podemos estimar um valor de θ_c para HbGp de aproximadamente 28 a 29 ns. Como o tempo de vida de fluorescência de FITC é cerca de 4 ns, seria mesmo difícil esperar observar um tempo de reorientação maior do que o tempo de vida do estado excitado da sonda. Isto poderia explicar o valor do tempo de correlação rotacional longo, θ_2 , de cerca de 2,4 ns obtido.

Figura 14: (A) Decaimentos da anisotropia de fluorescência da sonda FITC em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹ e de FITC ligada a oxi-HbGp. (B) Decaimentos da anisotropia de fluorescência da sonda FITC ligada a oxi-HbGp, na presença de 1,0 e 6,0 mol L⁻¹ de ureia.

Fonte: BARROS, A.E.B., BARIONI, M.B., CARVALHO, F.A.O., ITO A.S.,TABAK, M.*Glossoscolex paulistushemoglobin with fluorescein isothiocyanate: Steady-state and time-resolved fluorescence. Int. J. Biol. Macromol*, v.98, p. 777-785, 2017 [37].

Tabela 5: Resultados dos ajustes de decaimento da anisotropia de fluorescência: tempo de correlação rotacional (θ); anisotropia de tempo zero (r_0) e anisotropia residual (r_∞) da sonda FITC ligada à proteína, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0, com excitação em 492 nm e emissão em 515 nm, η é a viscosidade da solução.

Parâmetros	[Ureia] mol L ⁻¹					
	*	0	1	2,5	3,5	6,0
η	-	-	0,0106	0,0113	0,0119	0,0141
θ_1	0,19±0,01	0,37±0,04	0,33±0,03	0,36±0,03	0,36±0,03	0,36±0,02
B_1	0,28±0,01	0,20±0,02	0,20±0,01	0,20±0,01	0,14±0,01	0,17±0,01
θ_2	-	1,8±0,7	2,4±0,8	2,3 ± 0,4	2,4±0,2	2,6±0,2
B_2	-	0,06±0,02	0,05±0,01	0,07 ± 0,01	0,10±0,01	0,11±0,01
r_0	0,265	0,27	0,26	0,28	0,28	0,31
r_∞	-0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,03
χ^2 reduzido	1,036	1,023	0,964	0,940	1,015	0,962

* Amostra de FITC pura em tampão.

Convém mencionar que os resultados descritos acima foram publicados no artigo intitulado “*Glossoscolex paulistus* hemoglobin with fluorescein isothiocyanate: Steady-state and time-resolved fluorescence”, na revista International Journal of Biological Macromolecules, 2017. A partir desse trabalho surgiu uma questão interessante a ser estudada: avaliar a ligação da sonda de fluorescência fluoresceína isotiocianato (FITC) à forma apo-HbGp, onde os grupos hemes estão ausentes. Esse estudo nos ajudaria a explicar em mais detalhes os possíveis sítios de ligação da sonda FITC à oxi-HbGp, bem como os efeitos de supressão causados pelos grupos hemes na oxi-HbGp não modificada e na oxi-HbGp modificada pela sonda FITC. Em vista disso, a forma apo-HbGp foi modificada pela sonda FITC mas, infelizmente, no processo de diálise realizado, com o propósito de remover a sonda FITC livre, foi observado um precipitado que impossibilitou o avanço nesse estudo. Por esse motivo, a sonda fluorescente 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (1,8-ANS), que se liga de forma não covalente, foi utilizada para estudar a forma apo-HbGp na ausência e presença de diferentes concentrações do agente desnaturante ureia em experimentos de eletroforese, ultracentrifugação analítica, DLS, absorção óptica, dicroísmo circular, fluorescência estática e fluorescência resolvida no tempo. Vale destacar que o estudo da forma apo-HbGp é inédito em relação às pesquisas já realizadas pelo grupo de Biofísica Molecular do Instituto de

Química de São Carlos (IQSC/USP). Por isso, a maior parte dos experimentos foi para caracterizar a forma apo-HbGp. Na sequência, serão apresentados os resultados desses experimentos que compõem a segunda parte do capítulo 4.

PARTE II

ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DA APO-HbGp
EXTRAÍDA DA HEMOGLOBINA EXTRACELULAR
GIGANTE DE *GLOSSOSCOLEX PAULISTUS* (HbGp),
NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA SONDA DE
FLUORESCÊNCIA 1-ANILINO-8-NAFTALENO-
SULFONATO (ANS)

4.2 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DA APO-HbGp EXTRAÍDA DA HbGp, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA SONDA DE FLUORESCÊNCIA ANS.

4.2.1 Determinação da concentração da apo-HbGp

Na Tabela 6 são apresentados os valores das absorbâncias medidas em 562 nm referentes a diferentes valores de concentração da proteína padrão BSA, bem como, das diferentes diluições da apo-HbGp. A curva padrão de BSA mostrada na Figura 15 foi plotada a partir dos valores médios (Tabela 6), empregando um ajuste linear usando o software Origin (versão 8.5). A concentração obtida da apo-HbGp neste experimento foi de $4,1 \pm 0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$. Este valor foi obtido a partir da equação linear $y = 0,02 + 1,19.x$, onde y corresponde ao valor médio de absorbância, 0,02 é o coeficiente linear e 1,19 é o coeficiente angular da curva padrão (Figura 15), enquanto o x corresponde ao valor de concentração desconhecida. Baseando-se no valor de concentração da apo-HbGp encontrado, foi possível determinar espectrofotometricamente o coeficiente de extinção molar da apo-HbGp utilizando a lei de Lambert-Beer, obtendo-se o valor de $\varepsilon_{280 \text{ nm}} = 1,7 \pm 0,3 (\text{mg/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Tabela 6: Valores de absorbâncias em 562 nm da BSA e apo-HbGp

Amostras	Abs 1	Abs 2	Média
[BSA] mg mL⁻¹			
0,125	0,171	0,169	$0,17 \pm 0,01$
0,25	0,335	0,347	$0,34 \pm 0,01$
0,5	0,629	0,628	$0,63 \pm 0,01$
0,75	0,950	0,942	$0,95 \pm 0,01$
1,0	1,183	1,182	$1,18 \pm 0,01$
Apo-HbGp (diluições)			
1:40	0,160	0,161	$0,16 \pm 0,01$
1:20	0,268	0,271	$0,27 \pm 0,02$
1:10	0,502	0,503	$0,50 \pm 0,01$

Figura15: Curva padrão da absorbância medida em 562 nm em função da concentração de BSA, onde o protocolo do kit “BCA – Protein Assay Kit (PIERCE)” foi usado.

4.2.2 Eletroforese SDS-PAGE da apo-HbGp

A Figura 16 mostra os géis de eletroforese da oxi-HbGp e da apo-HbGp, na ausência e presença do β -mercaptoetanol (Figuras 16A e 16B, respectivamente). No primeiro poço do gel estão os padrões de proteína com massas moleculares no intervalo de 10 a 250 kDa representados pela letra “S”. Na Figura 16, os poços I a III correspondem às amostras da oxi-HbGp e os poços de IV a VI referem-se às amostras da apo-HbGp, ambas em diferentes concentrações crescentes.

Na Figura 16 observa-se uma banda intensa correspondente ao trímero **abc**, cuja massa estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi 55 ± 1 kDa (Tabela 7). Em estudos prévios a massa estimada para esta subunidade foi de 52 kDa baseada nos experimentos de MALDI-TOF-MS [72]. Considerando que SDS-PAGE é uma técnica limitada para o cálculo de massas, o resultado obtido no presente estudo foi próximo ao resultado obtido usando a técnica MALDI-TOF-MS.

Figura 16: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da oxi-HbGp e da apo-HbGp. As massas moleculares de proteínas padrão, na faixa de 250 a 10 kDa, e são indicadas do lado esquerdo da figura pela letra S. (A) Eletroforese em gel na ausência de β -mercaptoetanol e (B) com o agente redutor. Os poços indicados pelos algarismos romanos I, II e III correspondem à oxi-HbGp em concentrações crescentes enquanto os poços IV, V e VI referem-se às concentrações crescentes da apo-HbGp.

Por outro lado, nos poços IV a VI, as bandas correspondentes ao trímero da apo-HbGp são significativamente menos intensas quando comparadas às bandas referentes ao trímero da oxi-HbGp (Figura 16A). Este resultado sugere que a concentração de trímero presente nas amostras da apo-HbGp é muito menor quando comparada com a da oxi-HbGp nativa (Figura 16A). Além disso, os dados de ultracentrifugação analítica que serão apresentados na próxima seção mostram um decréscimo no valor de massa desta subunidade (Tabela 8), devido, provavelmente, a que parte do trímero está parcialmente desenovelado e desnaturado. Nas amostras da oxi-HbGp duas bandas são também observadas, associadas às cadeias *linkers*, e as massas estimadas para estas subunidades foram de $31,7 \pm 0,1$ e 26 ± 1 kDa (Tabela 7).

Tabela 7: Massas moleculares das subunidades da apo-HbGp, obtidas por eletroforese SDS-PAGE, na ausência e presença de β -mercaptoetanol.

<i>Subunidades</i>	<i>Massas (kDa)</i>			
	<i>Oxi-HbGp^a</i>	<i>Apo-HbGp^a</i>	<i>Oxi-HbGp^b</i>	<i>Apo-HbGp^b</i>
Trímero (abc)	55 $\pm$ 1	56 $\pm$ 1	-	-
<i>Linker</i>	31,7 $\pm$ 0,1	31 $\pm$ 1	33 $\pm$ 2	34 $\pm$ 1
<i>Linker</i>	26 $\pm$ 1	26 $\pm$ 1	26 $\pm$ 1	26 $\pm$ 1
Dímero ^c	-	28 $\pm$ 1	-	-
Monômero (c)	-	-	14,6 $\pm$ 0,3	-
Monômero (b)	-	14,1 $\pm$ 0,1	13,7 $\pm$ 0,4	13,8 $\pm$ 0,5
Monômero (d)	12,2 $\pm$ 0,05	12,1 $\pm$ 0,1	12 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1

^a amostras na ausência de β -mercaptoetanol

^b amostras na presença de β -mercaptoetanol

^c Dímero do monômero b

Entretanto, para a apo-HbGp foram observadas três bandas, onde duas dessas bandas correspondem às cadeias *linkers*, similares às cadeias da oxi-HbGp, e a outra pode estar associada ao dímero de monômero **b**, **b₂**, com massa estimada de 28 $\pm$ 1 kDa (Tabela 7). Isto ocorre, provavelmente, devido ao processo de preparação da apo-HbGp promover a dissociação oligomérica da proteína íntegra em trímeros **abc** e monômeros **d**. Além disso, ocorre a dissociação do trímero **abc** e a liberação do monômero **b**. Esta subunidade possui três aminoácidos cisteínas, onde um deles está livre para formar ligações dissulfeto com outra subunidade **b**, caracterizando uma ligação intermolecular e consequentemente a formação de dímero **b₂**. O monômero **b** correspondente é claramente visto próximo a banda do monômero **d** (Figura 16A). O valor da massa estimada do monômero **b** originado a partir do trímero **abc** foi 14,1 $\pm$ 0,1 kDa enquanto que o valor de massa calculado para o monômero **d** foi 12,1 $\pm$ 0,1 kDa (Tabela 7). Vale destacar que estes resultados são confirmados através dos dados de ultracentrifugação analítica descritos mais adiante, onde se verifica uma alta porcentagem de monômero **d** na solução de apo-HbGp (Figura 17, Tabela 8). Finalmente, nos poços I a III (oxi-HbGp), a banda referente ao monômero **d**, com massa estimada de 12, 2 $\pm$ 0,05 kDa, é observada (Figura 16A e Tabela 7). Este resultado está de acordo com estudos prévios reportados na literatura [72].

Nas amostras que foram incubadas com β -mercaptoetanol, onde ocorre à quebra das ligações dissulfeto intermoleculares, permitindo que as subunidades de uma proteína se

separem independentemente, por SDS-PAGE, observa-se que a banda de 28 kDa desaparece (Figura 16B), e que ocorre um aumento na intensidade da banda do monômero **b**. Além disso, a contribuição da subunidade trímero **abc** não é observada (Figura 16B). Este resultado está associado à redução das ligações dissulfeto, que promove a dissociação do trímero nas subunidades monoméricas **a**, **b** e **c**. As subunidades monoméricas **a** e **c** não são visualizadas, provavelmente, devido ocorrer a precipitação dessas subunidades no processo de dissociação oligomérica durante a preparação da apo-HbGp.

Convém mencionar que em ambas Figuras 16A e 16B, verifica-se claramente um aumento significativo das intensidades das bandas correspondentes aos monômeros e *linkers*, indicativo de uma alta instabilidade da oxi-HbGp em relação ao método de extração dos grupos hemes. Como pode ser esperado, dissociação oligomérica e desnaturação parcial, ambos os processos contribuem para o aumento da quantidade das subunidades monoméricas e *linkers*, e conseqüentemente, para o desenovelamento do trímero, dissociação ou mesmo precipitação durante o preparo e redução significativa de sua contribuição na preparação final.

4.2.3 Dados de ultracentrifugação analítica (AUC) da apo-HbGp

As curvas de distribuição de coeficientes de sedimentação, c (s), para a apo-HbGp, em pH 7,0 na ausência (Figura 17A) e na presença (Figura 17B) de NaCl são mostradas abaixo. Nessas curvas duas espécies são observadas na solução, caracterizadas por coeficientes de sedimentação $s_{20,w}$ em torno de 2,0 S e 3,5 S (Tabela 8). Estes valores são atribuídos ao monômero **d** (pico mais intenso) e ao trímero **abc**, corroborando estudos anteriores para as subunidades da oxi-HbGp em condições que promovem a dissociação oligomérica [12,73], que reportaram coeficientes de sedimentação de 1,9 S para o monômero **d** e 3,6 S para o trímero **abc**. Os valores de $s_{20,w}$ para o monômero **d** da apo-HbGp e para o trímero **abc** são muito próximos aos valores reportados na literatura para essas subunidades nativas na presença de 5,0 mol L⁻¹ de ureia (Tabela 8). Vale destacar que a HbGp nativa em pH 7,0 é caracterizada por um único pico estreito de 58-59 S e massa molecular correspondente de 3,6 MDa [9].

Figura17: Distribuições contínuas dos coeficientes de sedimentação da apo-HbGp, em 50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio, pH 7,0 a 20 °C. (A) Curvas na ausência de NaCl e (B) na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl. Os valores de $s_{20,w}$ para cada concentração foram determinados como o valor máximo dos picos das curvas de $c(s)$. A Absorbância foi monitorada em 280 nm.

Os resultados apresentados da apo-HbGp mostram que o processo de extração dos grupos hemes para produzir a forma apo- promove a dissociação oligomérica da HbGp, e nenhuma espécie com coeficiente de sedimentação em torno de 58-59 S foi observada. Além disso, os valores de massas para o monômero **d** de 15,5 a 17,4 kDa são bastante semelhantes aos valores de massas obtidas por MALDI-TOF-MS [72]. Porém, os valores de massas obtidas para o trímero **abc** de 34,5 a 41 kDa são menores, assim como, os $s_{20,w}$ são deslocados para valores menores sugerindo que esta subunidade está parcialmente desenovelada.

A contribuição percentual do monômero **d** de 76 a 77 % é muito maior quando comparada à contribuição do trímero **abc** (Tabela 8), sugerindo que ocorre perda significativa desta espécie devido, provavelmente, à baixa estabilidade da subunidade trimérica sob condições de estresse, tais como, pH altamente ácido ou alcalino, temperaturas extremamente

baixas, e baixas concentrações de sal. Estudos prévios sobre a estabilidade oligomérica da HbGp, na presença do surfactante catiônico CTAC, em pH 7,0, mostraram que o surfactante promove a precipitação da espécie trimérica *abc* e o seu desenovelamento. Em baixas concentrações de CTAC, a subunidade trímero apresenta um $s_{20,w}$ de $4,6 \pm 0,4$ S enquanto em altas concentrações o surfactante induz um deslocamento de $s_{20,w}$ para um valor menor de $3,24 \pm 0,03$ S [74].

É importante destacar que a presença de 50 mmol L^{-1} de NaCl não causa mudanças significativas nas propriedades hidrodinâmicas do monômero *d* e do trímero *abc*. No entanto, nas distribuições dos coeficientes de sedimentação apresentadas na Figura 17 nota-se que ocorre um efeito de estabilização da apo-HbGp induzido pelo sal. Além disso, os dados de DLS que serão apresentados na sequência mostram que, na presença de NaCl, o processo de agregação na solução de apo-HbGp é inibido e que as partículas de tamanhos menores são predominantes na solução (Figura 18C).

Por outro lado, a presença de espécies com diâmetros hidrodinâmicos acima de 50 nm (raio de Stokes acima de 25 nm) não foram detectadas nos dados de ultracentrifugação analítica, e isto pode estar associado ao tempo menor de medida de AUC, em torno de 8 horas quando comparado ao tempo de medida de DLS que foi de 17 horas, em que as contribuições de espécies agregadas são mais significativas em solução (Figura 18).

Tabela 8: Propriedades hidrodinâmicas das subunidades da apo-HbGp determinadas por velocidade de sedimentação (SV) em tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, em pH 7,0, a 20 °C, onde ($s_{20,w}$) em (S) representa os coeficientes de sedimentação, (MM) as massas moleculares em (kDa), (R_s) os raios de Stokes em (nm) e as áreas dos picos em (%). Os experimentos foram realizados na presença e ausência de NaCl.

[NaCl] mmol L ⁻¹	<i>Espécies em solução</i>						
	Propriedades	<i>Monômero, d</i>			<i>Trímero, abc</i>		
0,0	$s_{20,w}$	1,91 ± 0,05	-	-	3,2 ± 0,2	-	-
	MM	15,5 ± 0,4	-	-	34,5 ± 0,3	-	-
	R_s	1,94 ± 0,03	-	-	2,5 ± 0,1	-	-
	Área(%)	77 ± 11	-	-	23 ± 8	-	-
50,0	$s_{20,w}$	1,86 ± 0,06	1,9 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,6 ^b	3,4 ± 0,3	3,6 ± 0,2 ^a	4,1 ± 0,6 ^b
	MM	17,4 ± 0,8	17,0 ± 0,5 ^a	17,0 ± 2,0 ^b	41 ± 2	51,0 ± 0,4 ^a	53 ± 2 ^b
	R_s	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,1	3,4 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,2 ^b
	Área (%)	76,4 ± 0,6	-	-	23,6 ± 0,6	-	-

^a Propriedades hidrodinâmicas para as espécies nativas, monômero **d** e trímero **abc**, obtidas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) reportadas na referência [73].

^b Propriedades hidrodinâmicas do monômero **d** e trímero **abc**, na presença de 5 mol L⁻¹ de ureia reportadas na referência [12].

4.2.4 Dados de espalhamento dinâmico de luz(DLS) da apo-HbGp

Neste estudo de DLS, a estabilidade da apo-HbGp, nas concentrações de 0,7 mg mL⁻¹ e 1,4 mg mL⁻¹, na ausência de sale 0,7 mg mL⁻¹ na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl, foi observada durante o período de 23 horas de medida da amostra recém preparada. As curvas de distribuição de tamanhos baseadas na intensidade de espalhamento são apresentadas nas Figuras 18A, 18B e 18C nas respectivas concentrações mencionadas anteriormente, enquanto nas Figuras 19A, 19B e 19C são mostradas as curvas de distribuição com base no número de partículas espalhadas. Os resultados da distribuição de tamanhos baseados na intensidade nos primeiros doze minutos mostraram dois picos com valores de diâmetro hidrodinâmico (D_H) em torno de 6,3 nm e 106,3 nm, respectivamente (Figura 18A). Na Figura 18B também se observa dois picos centrados em 6,7 nm e 97,4 nm nesse mesmo intervalo de tempo, sendo o primeiro pico mais intenso quando comparado ao primeiro pico da Figura 18A. Essa intensidade maior pode ser atribuída à presença de um número maior de monômeros na solução, devido à concentração da amostra ser duas vezes maior. Por outro lado, na Figura 18C referente a apo-HbGp, na presença de NaCl, o segundo pico apresenta um D_H em torno de 59,8 nm, sendo esse valor bem menor quando comparado aos segundos picos das curvas

referentes ao tempo de 12 minutos de experimento das Figuras 18A e 18B, indicando que, provavelmente, a forma apo-HbGp na presença do NaCl, é mais estável, induzindo a formação de agregados menores.

Figura 18: Curvas da distribuição de intensidade de espalhamento para apo-HbGp (A) 0,7 mg mL⁻¹. (B) 1,4 mg mL⁻¹. (C) 0,7 mg mL⁻¹ na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl.

Assim, aparentemente, a presença de NaCl inibe a agregação da proteína, produzindo agregados menores. Vale ressaltar ainda que esse resultado da apo-HbGp com sal apresentar uma estabilidade maior também foi observado nos dados de ultracentrifugação analítica. O pico mais intenso com D_H de 6,3 a 6,7 nm (Figuras 18A, 18B e 18C) pode estar associado a uma mistura de contribuições das subunidades: trímeros e monômeros, visto que num estudo prévio os diâmetros hidrodinâmicos encontrados para essas subunidades foram: 6,8 nm e 5,0 nm, respectivamente [73]. Além disso, como o grupo heme não está presente na forma apo-

hemoglobina, é possível que as espécies formadas (monômero e trímero) são menores do que as espécies íntegras com o grupo heme ligado, como verificado por AUC (Tabela 8). O segundo pico de 59,8 a 106,3 nm (Figura 18A, 18B e 18C) pode ser atribuído à formação de agregados da proteína desenovelada, uma vez que, provavelmente, o processo de extração dos grupos hemes para a obtenção da forma apo-HbGp promove o desenovelamento parcial e a dissociação oligomérica da proteína, como observado nos dois picos de DLS.

Convém mencionar que estudos realizados com apo-mioglobina mostraram que a remoção do grupo prostético pode promover o aparecimento de um estado parcialmente enovelado [75]. Nos tempos maiores de medida de 257 minutos a 1366 minutos (Figuras 18A e 18B), os valores dos diâmetros hidrodinâmicos dos primeiros picos permanecem praticamente constantes, mas as intensidades desses picos diminuem com o aumento do tempo. Além disso, verifica-se que os diâmetros hidrodinâmicos dos segundos picos associados aos agregados tornam-se mais pronunciados em torno de 111,6 a 818,3 nm (Figuras 18A e 18B). Isso significa que as espécies que compõem a primeira população de partículas (1º pico) estão interagindo cada vez mais com as espécies referentes ao segundo pico com o passar do tempo. Entretanto, esse comportamento não é observado para a apo-HbGp na presença de NaCl (Figura 18C), uma vez que as curvas se mantêm praticamente constantes, indicando que apo-HbGp se estabiliza na presença do sal, como foi mencionado anteriormente. Provavelmente, a presença de NaCl blinda de alguma maneira as espécies formadas em solução, impedindo a interação de espécies menores entre si e com os agregados. Vale salientar que esses resultados da apo-HbGp são bastante diferentes ao serem comparados com a proteína oxi-HbGp na forma íntegra que apresenta apenas um pico centrado em 27 nm, indicando que o sistema é monodisperso e muito estável [18].

Em contrapartida, a maior parte das curvas de distribuição de número de partículas espalhadas mostram apenas um pico em torno de 2,7 a 4,0 nm (Figuras 19A, 19B e 19C) indicando que a distribuição de partículas é aproximadamente monodispersa e que a contribuição das partículas em torno de 53,6 a 818,3 nm observada nos segundos picos das curvas de distribuição de tamanho baseadas na intensidade (segunda população) é tão baixa que não é detectada pela distribuição de número de partículas. Vale ressaltar que esse pico de aproximadamente 3,6 nm sugere que, provavelmente, a apo-HbGp é constituída de uma mistura de subunidades que contém valores baixos de diâmetro hidrodinâmico e que o processo de obtenção da apo-HbGp promove a dissociação do oligômero. Entretanto, as Figuras 19A e 19B mostram curvas do número de partículas com diâmetros hidrodinâmicos

de 13,4; 50,5 e 18,4 nm, respectivamente, evidenciando fortemente a presença de agregados e mostrando que a forma apo-HbGp é muito instável no tempo quando comparada a forma oxi-HbGp.

Figura 19: Curvas de distribuição do número de partículas para apo-HbGp (A) 0,7 mg mL⁻¹. (B) 1,4 mg mL⁻¹. (C) 0,7 mg mL⁻¹ na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl.

4.2.5 Dados de absorção óptica, dicroísmo circular e fluorescência estática da apo-HbGp

A Figura 20 mostra os espectros de absorção óptica da oxi-HbGp e da apo-HbGp, monitorados na faixa de 250 a 700 nm. O espectro da oxi-HbGp apresenta as bandas de absorção características da forma nativa da proteína, banda dos aminoácidos aromáticos (280 nm), banda de Soret, centrada em 415 nm, e bandas Q (α e β) centradas em 540 e 575 nm, respectivamente. Por outro lado, a apo-HbGp apresenta somente a banda dos aminoácidos aromáticos, centrada em 280 nm, indicando que a extração dos grupos hemes da proteína foi bastante efetiva.

Figura 20: Espectros de absorção óptica da apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) e da oxi-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0.

Nas Figuras 21A e 21B são mostrados os espectros de dicroísmo circular (CD) para oxi-HbGp e apo-HbGp nas regiões das ligações peptídicas e do grupo heme, respectivamente. Os espectros na região das ligações peptídicas (Figura 21A) mostram perfil típico de proteína com grande contribuição de estruturas em hélices alfa, com elipticidade negativa em 220-222 nm. Entretanto, no caso da forma apo-HbGp observa-se uma diminuição nesse tipo de estrutura. Convém mencionar que num estudo prévio de apo-hemoglobina extraída da hemoglobina de cavalo também foi observado uma perda de estruturas hélices alfa [76]. Por outro lado, na Figura 21B observam-se no espectro da oxi-HbGp duas bandas características em 262 e 414 nm que correspondem, respectivamente, às contribuições dos aminoácidos aromáticos e à assimetria do grupo heme (banda de Soret). O espectro referente a apo-HbGp mostra claramente uma mudança abrupta na região dos aminoácidos aromáticos (Figura 21B),

bem como, é evidente a ausência da banda de Soret, indicando que foi satisfatória a extração dos grupos hemes corroborando o resultado de absorção óptica apresentado anteriormente.

Figura 21: Espectros de dicroísmo circular (CD) da oxi-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$) e da apo-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$), em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH 7,0, na região das ligações peptídicas (A) e do grupo heme (B).

Os espectros de emissão de fluorescência da apo-HbGp e da oxi-HbGp, com excitação em 295 nm e emissão na faixa de comprimentos de onda entre 305 e 450 nm, são mostrados na Figura 22. A partir desses espectros foram estimados os valores de áreas, cujos resultados obtidos foram aproximadamente 132805 u.a para o espectro da apo-HbGp e 1535 u.a para o espectro da oxi-HbGp, sendo o valor de área do espectro da apo-HbGp 86,5 vezes maior do que a área do espectro da oxi-HbGp. Esta diferença abrupta está associada à ausência dos grupos hemes na forma apo-HbGp, uma vez que estes grupos hemes suprimem intensamente a emissão de fluorescência dos triptofanos da oxi-HbGp. Vale ressaltar que esta supressão expressiva ocorre porque os triptofanos presentes na oxi-HbGp transferem energia para os

grupos hemes, como descrito na literatura [22,37], reduzindo drasticamente o rendimento quântico dos triptofanos da HbGp nativa.

Figura 22: Espectros de emissão de fluorescência da apo-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$) e da oxi-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$) em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0 com excitação em 295 nm. O inserto corresponde à expansão da figura mostrando a curva da oxi-HbGp. Observe a diferença nos valores das ordenadas.

4.2.6 Apo-HbGp em concentrações diferentes de ANS

A Figura 23A mostra os espectros de absorção óptica da apo-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$), em pH 7,0, em função da concentração da sonda ANS. Nesses espectros destaca-se a banda dos aminoácidos aromáticos centrada em 280 nm, característica da hemoglobina na forma apo-HbGp, ou seja, sem os grupos hemes, consequentemente sem a banda de Soret (415 nm) e sem as bandas Q (540 e 575 nm). A absorbância da banda dos aminoácidos aromáticos (280 nm), em função da concentração de ANS, mostrada na Figura 23B, não apresenta variação expressiva, sugerindo que o ambiente em torno dos aminoácidos aromáticos não sofre alterações devido à presença da sonda ANS.

Figura 23: (A) Espectros de absorção óptica da Apo-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$), na presença da sonda ANS, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0. (B) Gráfico da absorbância na banda dos aminoácidos (280 nm) em função da concentração de ANS.

Os espectros de emissão da apo-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$), na ausência e na presença de diferentes concentrações da sonda ANS, com excitação em 295 nm, são mostrados na Figura 24A. O pico I está associado à emissão dos triptofanos e o pico II corresponde à emissão da sonda ANS. A Figura 24B mostra as áreas dos espectros de emissão dos triptofanos (pico I) e do ANS (pico II), com excitação em 295 nm. As áreas dos espectros de emissão de fluorescência do ANS (pico II) e o deslocamento do máximo de emissão, com excitação em 295 e 350 nm são apresentadas nas Figuras 24C e 24D, respectivamente. Nas Figuras 24A e 24B observa-se um decréscimo na intensidade de emissão de fluorescência dos triptofanos (pico I), enquanto que na intensidade de emissão de fluorescência da sonda ANS, nota-se um aumento (pico II). Este comportamento indica que, provavelmente, os triptofanos juntamente com outros aminoácidos hidrofóbicos, ocupam sítios em que a sonda se encontra, possivelmente totalmente ligada. E isso se torna consistente ao se analisar a Figura 24D que mostra o deslocamento do máximo de emissão, em função da concentração de ANS, onde se verifica um comportamento constante, sugerindo que a sonda está localizada num ambiente protegido do solvente, uma vez que, é conhecido na literatura que esta sonda quando está em

solução aquosa exibe um comprimento de onda do máximo de fluorescência de aproximadamente 515 nm [42]. Os gráficos de áreas de emissão de fluorescência apresentados na Figura 24C mostram que as amostras excitadas em 295 nm exibem uma intensidade de emissão de fluorescência maior do que as amostras excitadas em 350 nm, evidenciando que ocorre transferência parcial de energia dos triptofanos da apo-HbGp para a sonda ANS [77-79].

Figura 24: (A) Espectros de emissão de fluorescência da apo-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$) na presença de diferentes concentrações da sonda ANS em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0, com excitação em 295 nm. (B) Gráficos das áreas do pico I e pico II, em função da concentração de ANS. (C) e (D) Gráficos das áreas e (D) do máximo de emissão de fluorescência referente ao pico II em função da concentração da sonda ANS.

4.2.7 Efeitos das diferentes concentrações de ureia na estrutura da apo-HbGp e da sonda ANS

A Figura 25A mostra os espectros de emissão de fluorescência da apo-HbGp em diferentes concentrações de ureia na presença de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ANS com excitação em 295 nm. O pico I corresponde à emissão dos triptofanos enquanto o pico II está relacionado à emissão da sonda ANS. O gráfico das áreas normalizadas correspondente ao pico I é apresentado na Figura 25B, onde se observa um decréscimo na intensidade de fluorescência em altas concentrações de ureia, podendo ser atribuído, provavelmente, ao efeito do solvente, uma vez que o grupo químico indol presente nos triptofanos é bastante afetado pelo ambiente local. É conhecido na literatura que ocorre um deslocamento do máximo de emissão para o vermelho, isto é, para transições de menores energias em solventes polares [54]. Vale ressaltar que esse deslocamento é mostrado na Figura 25C e também é observado para oxi-HbGp na presença de desnaturante [68], porém, na oxi-HbGp, o efeito do solvente, com o deslocamento batocrômico também ocorre, mas não é tão pronunciado, devido à presença dos grupos hemes.

Figura 25: (A) Espectros de emissão de fluorescência da apo-HbGp ($0,14\text{mgmL}^{-1}$) com diferentes concentrações de ureia e na presença de $10\text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ de ANS, em tampão fosfato de sódio 30 mmolL^{-1} , pH 7,0 com excitação em 295 nm . (B) Gráfico das áreas referentes ao pico I do espectro de emissão de fluorescência normalizadas a partir da concentração de $0,0\text{ mmolL}^{-1}$ de ureia, em função da concentração do desnaturante. (C) Gráfico do deslocamento do comprimento de onda do máximo de emissão de fluorescência referente ao pico I, em função da concentração de ureia.

Os espectros de emissão de fluorescência da apo-HbGp, em diferentes concentrações de ureia, na presença de $10\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANS, em pH 7,0, com excitação em 350 nm , são mostrados na Figura 26A. Observa-se que o aumento da concentração de ureia promove um decréscimo significativo na emissão de fluorescência da sonda ANS (Figuras 26A e 26B) e um deslocamento do máximo de emissão para o vermelho de 464 para 505 nm (Figura 26C). Essa redução na intensidade de fluorescência da sonda é observada na faixa até $5,0\text{ mol L}^{-1}$ de ureia, e ocorre, provavelmente, porque esse desnaturante induz uma diminuição dos grupos hidrofóbicos na superfície da apo-HbGp. Isso leva à maior exposição da sonda ao solvente, sendo que essa sonda ANS tem rendimento quântico de fluorescência muito baixo em ambiente aquoso [42]. Em estudos prévios da oxi-HbGp em diferentes concentrações de

ureia, na presença de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ANS, foram observados efeitos semelhantes ao descrito acima para a sonda ANS, só que essa redução é observada até $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ureia [68], indicando que o efeito da ureia na sonda ANS na apo-HbGp é evidenciado em concentrações maiores de desnaturante. Essa diferença na apo-HbGp poderia ser também devido à extração do grupo heme produzir uma dissociação oligomérica parcial da proteína ou que a sonda ocupa o bolsão do grupo heme estando mais protegida do solvente do que na oxi-HbGp.

Figura 26: (A) Espectros de emissão de fluorescência da sonda ANS ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) ligada a apo-HbGp ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$), na presença e na ausência de ureia, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0. (B) Gráfico da área total de emissão de fluorescência normalizada a partir da concentração de $0,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia. (C) Gráfico do deslocamento do máximo de emissão de fluorescência (λ) em função da concentração de ureia. $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$.

4.2.8 Dados de fluorescência resolvida no tempo

Os experimentos de fluorescência resolvida no tempo foram realizados com comprimento de onda de excitação de 292 nm (triptofanos). A emissão foi monitorada em dois comprimentos de onda, 340 nm para triptofanos e 475 nm para a sonda ANS. As Tabelas 9 e 10 mostram os resultados obtidos desses experimentos com os parâmetros obtidos pelo ajuste dos decaimentos de fluorescência, tais como: tempos de vida de fluorescência (τ_i em

ns), as contribuições percentuais (α_i em%) e os coeficientes pré-exponenciais (β_i) para cada componente. Em geral, os decaimentos são multi-exponenciais, sendo que para os triptofanos foram obtidos três tempos de vida, todos na ordem de nanossegundos (Tabela 9). Os decaimentos da sonda ANS ligada à proteína são bi-exponenciais (Tabela 10) com dois tempos de vida. Vale ressaltar que uma apresentação mais detalhada dos resultados dos decaimentos tanto para os triptofanos quanto para a sonda ANS é realizada na sequência.

4.2.8.1 Emissão dos triptofanos da apo-HbGp

Os resultados dos tempos de vida de fluorescência da apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) em diferentes meios estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros obtidos por fluorescência resolvida no tempo da apo-HbGp (0,14 mg mL⁻¹) em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0, na presença de diferentes sistemas. $\lambda_{exc}=292$ nm e $\lambda_{em}=340$ nm.

Parâmetros	Meios			
	Tampão puro	4 mol L ⁻¹ ureia	10 μ mol L ⁻¹ ANS	20 μ mol L ⁻¹ ANS
τ_1 (ns)	0,73 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,03
α_1 (%)	7	10	7	7
β_1	0,26	0,30	0,28	0,30
τ_2 (ns)	2,4 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1
α_2 (%)	41	44	42	41
β_2	0,47	0,47	0,47	0,44
τ_3 (ns)	5,4 $\pm$ 0,1	5,9 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 0,1
α_3 (%)	52,5	46	51	52
β_3	0,27	0,23	0,25	0,26
$\langle\tau\rangle$ (ns)	3,9	4,1	3,9	3,9
χ^2 reduzido	1,06	1,03	1,06	1,07

Na Figura 27 os decaimentos de fluorescência da apo-HbGp pura e da apo-HbGp na presença de 4 mol L⁻¹ de ureia (Figura 27A), e da apo-HbGp na presença de 10 e 20 μ mol L⁻¹ de ANS (Figura 27B) são mostrados.

Figura 27: Decaimentos da intensidade de fluorescência da apo-HbGp em tampão puro e na presença de 4 mol L⁻¹ de ureia (A) e da apo-HbGp na presença de 10 e 20 µmol L⁻¹ de ANS (B), em tampão fosfato de sódio 30 mmol L⁻¹, pH 7,0. λ_{ex} = 294 nm e λ_{em} = 340 nm.

A primeira medida controle foi feita para a apo-HbGp pura em tampão fosfato 30 mmol L⁻¹, pH 7,0. Verifica-se um decaimento multi-exponencial, com três tempos de vida de 0,73 ns, 2,4 ns e 5,4 ns (Tabela 9). O valor de tempo de vida médio calculado de 3,9 ns reflete a predominância das contribuições dos tempos mais longos. É importante mencionar que em um estudo prévio de fluorescência resolvida no tempo da oxi-HbGp [37] foram observados tempos curtos de 0,03 ns e 0,27 ns cujas contribuições percentuais correspondem a 80% do total da intensidade de fluorescência [37]. Entretanto, no presente estudo da apo-HbGp esses tempos tão curtos não foram observados, e o tempo relativamente curto de 0,73 ns encontrado para a apo-HbGp apresenta uma contribuição de apenas 7% (Tabela 9, 2ª coluna). Os 93% restantes das contribuições percentuais estão associados aos tempos longos: 2,4 ns e 5,4 ns. E isso ocorre porque a supressão promovida pelos grupos hemes observada para a oxi-HbGp não acontece para a apo-HbGp, uma vez que foram removidos os grupos hemes. Na presença de 4 mol L⁻¹ de ureia, observa-se também um decaimento multi-exponencial com três tempos de vida: 0,94 ns, 2,8 ns e 5,9 ns para a apo-HbGp no mesmo tampão. Nesse caso observa-se um pequeno aumento em todos os valores dos tempos de vida quando comparado a apo-HbGp pura no tampão, o que pode estar associado tanto a supressão inexistente, bem como, a uma maior exposição dos triptofanos ao solvente, uma vez que nessa concentração de desnaturante a apo-HbGp, provavelmente, encontra-se parcialmente desnaturada. Com relação aos tempos de vida da apo-HbGp, na presença de 10 e 20 µmol L⁻¹ de ANS, são bem semelhantes aos observados para a apo-HbGp pura, indicando que o ambiente dos triptofanos não sofre

modificações na presença da sonda ANS, corroborando os resultados obtidos por absorção óptica dessa proteína na presença de diferentes concentrações dessa sonda fluorescente.

4.2.8.2 Emissão da sonda ANS ligada a apo-HbGp

Os parâmetros de decaimentos de fluorescência da sonda ANS nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, ligada à apo-HbGp, são apresentados na Tabela 10. Foram obtidos dois valores de tempos de vida longos, em torno de 7 e 18 ns. Esse tempo de 18 ns também foi observado por Kinoshita e colaboradores [80] num estudo realizado com a apo-hemoglobina humana. Vale mencionar que as diferentes concentrações de 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da sonda ANS não induziram mudanças significativas nos valores de tempos de vida, principalmente nos valores calculados de tempo de vida médio, cujo valor obtido foi de 8 ns nas duas concentrações da sonda. Esses dois valores de tempos de vida longos devem corresponder a ligação da sonda à apo-HbGp em ambientes hidrofóbicos diferentes, bem protegidos do solvente. Em vista disso, pode-se afirmar que, provavelmente, não existem moléculas de sonda livre, isto é, todas as moléculas de sonda estão associadas à apo-HbGp, pois essa sonda em tampão puro apresenta um tempo de vida médio muito curto de 0,28 ns [23].

Tabela 10: Parâmetros obtidos por fluorescência resolvida no tempo da sonda ANS em tampão fosfato 30 mmol L^{-1} , pH 7,0, na presença da apoHbGp. $\lambda_{\text{exc}} = 292\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 475\text{ nm}$.

	τ_1 (ns)	α_1 (%)	β_1	τ_2 (ns)	α_2 (%)	β_2	$\langle\tau\rangle$ (ns)	χ^2
ApoHbGp +10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANS	7,2 $\pm$ 0,1	16	0,98	18,7 $\pm$ 0,004	84	0,02	8	1,32
ApoHbGp +20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANS	7,7 $\pm$ 0,1	16	0,98	18,8 $\pm$ 0,004	84	0,02	8	1,25

Figura 28: Decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda ANS 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ligada a apo-HbGp, em tampão fosfato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0. $\lambda_{\text{ex}} = 292 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5 Conclusões

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a titulação de HbGp- FITC com ureia mostra uma transição em $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ureia, monitorada pela emissão de fluorescência tanto dos triptofanos como da sonda FITC. Nesta concentração de desnaturante ocorre a dissociação oligomérica da proteína. Uma segunda transição é observada em altas concentrações de ureia, onde acontece o desenovelamento da proteína, sendo monitorada somente pelos triptofanos. Portanto, a emissão dos triptofanos é sensível tanto à dissociação oligomérica da proteína como ao desenovelamento, enquanto a emissão da sonda FITC é sensível essencialmente à dissociação oligomérica.

Os estudos de fluorescência resolvida no tempo da oxi-HbGp mostram que os decaimentos de emissão de fluorescência dos triptofanos consistem de quatro tempos de vida, onde dois tempos se encontram na faixa de picossegundos e os outros dois na faixa de nanossegundos. A adição de ureia ao sistema HbGp-FITC induz uma diminuição drástica das contribuições dos tempos de vida curtos acima de $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ de desnaturante. Em altas concentrações de ureia, as maiores contribuições são dos tempos mais longos, associadas com a dissociação oligomérica da oxi-HbGp e desnaturação das subunidades isoladas.

Por outro lado, os resultados de decaimento de anisotropia para o sistema HbGp-FITC revelam um decaimento bi-exponencial e os tempos de correlação rotacional na ausência de ureia são de 0,37 e 1,8 ns. A adição de ureia causa um pequeno aumento no tempo de correlação longo para 2,4 ns. Estes dois tempos de correlação rotacional estão associados aos movimentos de reorientação da sonda relativa à proteína. Não se observam tempos mais longos característicos de reorientação da proteína como um todo, estimados em cerca de 20 a 30 ns. Isto se deve ao fato de os tempos de vida dos triptofanos serem relativamente curtos, sendo o mais longo da ordem de 5 ns.

Os resultados de eletroforese da apo-HbGp corroboram os dados de ultracentrifugação analítica (AUC) mostrando que o processo de extração dos grupos hemes promove a dissociação oligomérica da proteína, bem como, causa a desnaturação parcial das subunidades isoladas. Os resultados de AUC foram relevantes uma vez que mostraram quais espécies estão presentes na solução da apo-HbGp após a extração dos grupos hemes. Cerca de 77% das espécies são monômeros *d* e 23% são trímeros *abc*. Os dados de DLS também confirmam

que ocorre a dissociação do oligômero durante o processo de obtenção da apo-HbGp, e que essa forma apo- apresenta baixa estabilidade quando comparada à oxi-HbGp.

Os estudos de fluorescência estática mostram que a sonda ANS ocupa os sítios livres da apo-HbGp corroborando os dados descritos na literatura. A partir de 5 mol L⁻¹ de ureia observa-se um decréscimo significativo na intensidade de fluorescência da sonda ANS o que pode ser explicado pelo fato desse agente desnaturante expor a sonda ao solvente no processo de desnaturação da proteína e também devido a essa sonda não emitir fluorescência em ambiente aquoso (rendimento quântico de fluorescência próximo de zero).

Os estudos de fluorescência resolvida no tempo para apo-HbGp revelam a predominância de tempos de vida mais longos dos triptofanos devido à remoção da supressão promovida pelos grupos hemes, observada na oxi-HbGp. Observa-se um decaimento multi-exponencial, com três tempos de vida de 0,73 ns, 2,4 ns e 5,4 ns. Por outro lado, a sonda ANS ligada a apo-HbGp caracteriza-se por apresentar dois tempos longos de 7,2 e 18,7 ns, associados à ligação da sonda a proteína em ambientes bem protegidos do solvente. O tempo mais longo, de 18,7 ns, poderia estar associado ao movimento da sonda junto com a macromolécula. Seria bem interessante tentar no futuro medir experimentalmente o decaimento de anisotropia da sonda ANS ligada a apo-HbGp. Considerando que a sonda se liga à proteína através de interações hidrofóbicas, este seria um caso bastante peculiar de sonda não ligada covalentemente refletindo o movimento da proteína como um todo.

REFERÊNCIAS

1. STRYER, L. **Bioquímica**. New York: W. H. Freeman, 1995. 1000 p.
2. BACHEGA, José Fernando Ruggiero. **Estrutura cristalográfica da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, um complexo de 3,6 mega Daltons**. 2013. 165 f. Tese de Doutorado em Física Aplicada – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
3. BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Tradução de A. J. M.S. Moreira.; J. P de Campos.; P. A. Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1114 p.
4. NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. Tradução de A. A. Simões e W.R.N. Lodi. New York: Almed, 2011. 975 p.
5. VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. Tradução de A.B.G. da Veiga. et al. 3ª ed. Porto Alegre: Artemed, 2006. 1616 p.
6. REN, Z.; SRAJER, V.; KNAPP, J.E.; ROYER, W.E.J. Cooperative macromolecular device revealed by meta-analysis of static and time-resolved structures. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.109, n.1, p. 107-112, 2012.
7. WEBER, R.E., VINOGRADOV, S.N. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. **Physiological Reviews**, v.81, p. 569-628, 2001.
8. ROYER, W.E., SHARMA, H., STRAND, K., KNAPP, J.E., BHYRAVBHATLA, B. Lumbricus erythrocrutorin at 3.5 Å resolution: architecture of a megadalton respiratory complex. **Structure**, v. 14, p.1167-1177, 2006.
9. CARVALHO, F.A.O., SANTIAGO, P.S., BORGES, J.C., TABAK, M. On the molecular mass of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: analytical ultracentrifugation reexamination. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p.257-263, 2008.
10. KREBS, A., KUCHUMOV, A.R., SHARMA, P.K., BRASWELL, E.H., ZIPPER, P., WEBER, R.E., CHOTTARD, G., VINOGRADOV, S.N. Molecular shape, dissociation, and oxygen binding of the dodecamer subunit of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 18695-18704, 1996.
11. CARVALHO, J.W.P., CARVALHO, F.A.O., SANTIAGO, P.S., TABAK, M. Thermal denaturation and aggregation of hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in acid and neutral media. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 109-118, 2013.
12. CARVALHO, F.A.O., CARVALHO, J.W.P., SANTIAGO, P.S., TABAK, M. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: a dissociation model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 340–348, 2013.

13. 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. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 3, p. 333-345, 2006.

14. HEMARINA S.A. Empresa privada de biotecnologia. Pesquisa e desenvolvimento de transportadores de oxigênio de organismos de origem marinha para aplicações terapêuticas e industriais. Morlaix, 2007. Disponível em: < <http://www.hemarina.com> >. Acesso em: 17 agos. 2018.

15. CHRISTOFFERSEN, M.L. Biodiversity and distribution of the *Glossoscolex* genus group (Annelida, Clitellata, Lumbricina, Glossoscolecidae) in South America. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 2, p. 155-160, 2007.

16. BACHEGA, J.F.R., BLEICHER, L., HORJALES, E.R., SANTIAGO, P.S., GARRATT, R.C., TABAK M. Crystallization and preliminary structural analysis of the giant haemoglobin from *Glossoscolex paulistus* at 3.2 angstrom. **Journal of Synchrotron Radiation**, v.18, p. 24-28, 2011.

17. BACHEGA, J.F.R., MALUF, F.V., ANDI, B., PEREIRA, H.D., CARAZZOLLEA, M.F., ORVILLE, A.M., TABAK, M., BRANDÃO-NETO, J., GARRATT, R.C., HORJALES, E.R. The structure of the giant haemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Acta Crystallographica**, v.D71, p. 1257–1271, 2015.

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

19. CARVALHO, J.W.P., CARVALHO, F.A.O., BATISTA, T., SANTIAGO, P.S., TABAK, M. Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies. **Colloids and Surfaces B**, v. 118, p. 14–24, 2014.

20. KINDERLERER, J., LEHMANN, H., TIPTON, K.F. The Thermal Denaturation of Human Oxyhaemoglobins A, A2, C and S. **Biochemical Journal**, v. 135, p.805-814, 1973.

21. POLI, A.L., MOREIRA, L.M., INASATO, H. Autoxidation of giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Molecular mechanism and oligomeric implications. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 82, p. 306-315, 2011.

22. CARVALHO, F.A.O., SANTIAGO, P.S., TABAK, M. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 519, p.46-58, 2012.
23. BARROS, A.E.B., CARVALHO, F.A.O., ALVES, F.R., CARVALHO, J.W.P. TABAK, M. Denaturant effects on HbGp hemoglobin as monitored by 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) probe. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.74, p. 327–336, 2015.
24. HERMANSON, G.T. **Bioconjugate Techniques**. Illinois. Academic Press, 1996. 785p.
25. JACKSÉN, J.; DAHL, K.; KARLBERG, A.; REDEBY, T.; EMMER, A. Capillary electrophoresis separation and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry characterization of bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate conjugates. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 1125-1134, 2010.
26. HAUGLAND, R.P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. Eugene: Molecular Probes, 1996. p. 19-21.
27. GRUNWALDT, G.; HAEBEL, S.; SPITZ, C.; STEUP, M.; MENZEL, R. Multiple binding sites of fluorescein isothiocyanate moieties on myoglobin: photophysical heterogeneity as revealed by ground- and excited-state spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 67, p. 177-186, 2002.
28. CHIEN, S; SHOJI, O; MORIMOTO, Y; WATANABE, Y. Use of apomyoglobin to gently remove heme from a H₂O₂-dependent cytochrome P450 and allow its reconstitution. **New Journal of Chemistry**, v. 41, p. 302-307, 2017.
29. TEALE, F.W.J. Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.35, p.543-543, 1959.
30. ASCOLI, F.; ROSSI-FANELLI, M. R.; ANTONINI, E. **Methods in Enzymology**, v.76, p. 72-87, 1981.
31. WOODWARD, J.J.; MARTIN, N.I.; MARLETTA, M.A. An Escherichia coli expression-based method for heme substitution. **Nature methods**, v.4, n. 1, p. 43-45, 2007.
32. KUMAR, K.K.; DICKSON, C.F.; WEISS, M. J.; MACKAY, J.P.; GELL, D.A. Alpha-haemoglobin stabilizing protein (AHSP) stabilizes apo- α -haemoglobin in a partially folded state. **Biochemical Journal**, v.432, n. 2, p.275-282, 2010.
33. TAKASHI, H. Hemoproteins reconstituted with artificially created hemes, chapter 23 in **Handbook of Porphyrin Science with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine**, 2010, v.5, p. 2-58, edited by KADISH, K.M.; SMITH, K.M.; GUILARD, R..

34. SCHWARZINGER, S., MOHANA-BORGES, R., KROON, G. J., DYSON, H. J., WRIGHT, P. E. Structural characterization of partially folded intermediates of apomyoglobin H64F. **Protein Science**, v. 17, p.313–321, 2008.
35. CHOW, C.; KURT, N.; MURPHY, R.M.; CAVAGNERO, S. Structural Characterization of Apomyoglobin Self-Associated Species in Aqueous Buffer and urea Solution. **Biophysical Journal**,v. 90, p. 298-309, 2006.
36. TCHERKASSKAYA, O.; PTITSYN, O.B.; KNUTSON, J.R. Nanosecond Dynamics of Tryptophans in Different Conformational States of Apomyoglobin Proteins. **Biochemistry**, v. 39, p. 1879-1889, 2000.
37. BARROS, A.E.B.; BARIONI, M.B.; CARVALHO, F.A.O.; ITO, A.S. ; TABAK, M. Glossoscolexpaulistus hemoglobin with fluorescein isothiocyanate:Steady-state and time-resolved fluorescence. **International Journal of Biological Macromolecules**,v.98, p.777-785, 2017.
38. GASIMOV, O.K.; GLASGOW, B.J. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. **Biochimica et BiophysicaActa**, v. 1774, p. 403-411, 2007.
39. HAWE, A.; SUTTER, M.; JISKOOT. Extrensic fluorescent dyes as tools for protein characterization. **Pharmacological Research**,v. 25, n.7, p.1487-1499 , 2007.
40. SLAVIK, J. Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function.. **Biochimica et BiophysicaActa**, v. 694, p. 1-25, 1982.
- 41.RAY, S.S.; BALARAM, P. 1-Anilino-8-naphthalene-sulfonate (ANS) Binding to Proteins Investigated by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Correlation of Gas-Phase Dye Binding to Population of Molten Globule States in Solution. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, p. 7068-7072, 1999.
42. STRYER, L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin a fluorescent probe of non-polar binding sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 482 - 495, 1965.
43. HAOUZ, A.; MOHSNI, S.E.; ZENTZ, C.; MEROLA, F.; ALPERT, B. Heterogeneous motions within human apohemoglobin.**European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 250-257, 1999.
44. PACE, C. N.; HEBERT, E. J.; SHAW, K. L.; SCHELL, D.; BOTH, V.; KRAJCIKOVA, D.; SEVCIK, J.; WILSON, K. S.; DAUTER, Z.; HARTLEY, R. W.; GRIMSLEY, G. R. Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. **Journal of Molecular Biology**, v. 279, n. 1, p. 271-286, 1998.
45. SMITH,P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO,M. D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON,B.J.; KLENK, D.C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, p.76-85, 1985.

46. WIECHELMAN, K.J.; BRAUN, R.D.; FITZPATRICK, J.D. Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation. **Analytical Biochemistry**, v.175, p.231-237, 1988.
47. LAUE, T.M. Biophysical studies by ultracentrifugation. **Current Opinion in Structural Biology**, v.11, p. 579–583, 2001.
48. J. LEBOWITZ, M.S. LEWIS, P. SCHUCK. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. **Protein Science**, v. 11, p. 2067–2079, 2002.
49. NILAPWAR, S.J.; NARDELLI, M.; WESTERHOFF, H.V.; VERMA, M. **Methods in Enzymology**, v.500, p. 60-75, 2011
50. BORISSEVITCH, I. E.; GONÇALVES, P.J.; SCHABERLE, F.A. **Fundamentos da Espectroscopia da Absorção Óptica**. São Paulo: Livraria da Física, 2015. 113 p.
51. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
52. XU, J.; KNUTSON, J.R. **Methods in Enzymology**, v.450, p.160-179, 2008.
53. ITO, A.S.,BERARDI, M. PAZIN, W.M. **Fluorescência e aplicações em Biofísica**. São Paulo, Livraria da Física, 2016. 133 p.
54. LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Baltimore: Springer, 2006. 974 p.
55. VALEUR, B. **Molecular Fluorescence Principles and Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. 381 p.
56. BARIONI, Marina Berardi. **Propriedades estruturais de membrana modelo em interação com o composto anti- *Leishmania* miltefosina**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
57. BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**. V.235, p.337-352, 2016.
- 58.LORBER, B.; FISCHER, F.; BAILLY, M.; ROY, H.; KERN, D. Protein Analysis by Dynamic Light Scattering: Methods and Techniques for Students. **Biochemistry and molecular biology education**. V.40, n.06, p. 372-382, 2012.
59. ARZENŠEK, D. **Dynamic light scattering and application to proteins in solutions**.2010. 18 f. Faculdade de Matemática e Física, Universidade de Ljubljana, Eslovênia, 2010.
60. SCOTT, D. J.; HARDING, S. E.; ROWE, A.J. **Analytical Ultracentrifugation Techniques and Methods**. Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 2005.587 p.

61. SCHUCK, P.; ZHAO, H. Editorial for the special issue of methods “ Modern Analytical Ultracentrifugation. **Methods**. V. 54, p.1-3, 2011.
62. LEBOWITZ, J. LEWIS, M.S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. **Protein Science**. V. 11, p. 2067-2079, 2002.
63. VAN HOLDE, K.E.; JOHNSON, W.C.; HO, P.S. **Principles of physical biochemistry**. New York: Pearson Prentice Hall, 2006. 710 p.
64. EATON, W.; HOFRICHTER, J. Specific spectroscopic properties of hemoglobins. In: COLOWICH, S. P., E.; KAPLAN, N. O. (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1983. v. 76, p. 175-262.
65. SHARON, M. K.; JESS, T.J.; PRICE, N.C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1751, p.119-139, 2005.
66. CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I, The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v.3, n.5, p.164-173, 2009.
67. SANTIAGO, P.S.; CARVALHO, F.A.O.; DOMINGUES, M.M.; CARVALHO, J.W.P.; SANTOS, N.C, TABAK, M. Isoelectric point determination for *Glossoscolex paulistus* extracellular hemoglobin: oligomeric stability in acidic pH and relevance to Protein – Surfactant Interactions. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9794-9801, 2010.
68. BARROS, Ana Eliza Barbosa. **Estudos espectroscópicos da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp)**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Físico-química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
69. WONG, Y. H.; KADIR, H.A.; TAYYAB, S. Honey-Induced Protein Stabilization as Studied by Fluorescein Isothiocyanate Fluorescence. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-8, 2013.
70. HIRSCH, R.E.; VIDUGIRIS, G. J. A.; FRIEDMAN, J. M.; HARRINGTON, J.P. Alteration of tryptophan fluorescence properties upon dissociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1205, p. 248-251, 1994.
71. HUNGERFORD, G.; BENESCH, J.; MANO, J.F.; REIS, R. L. Effect of the labeling ratio on the photophysics of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to bovine serum albumin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, p.152-158, 2007.
72. CARVALHO, F.A.O., CARVALHO, J.W.P., SANTIAGO P.S., TABAK, M. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. **Process Biochemistry**, v. 46, p.2144-2151, 2011.

73. CARVALHO, F.A.O.; CARVALHO, J.W.P.; ALVES, F. R.; TABAK, M. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p.333-341, 2013.
74. CARVALHO, F.A.O.; ALVES, F. R.; TABAK, M. Ionic surfactants-Glossoscolex paulistus hemoglobin interactions: Characterization of species in the solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p.670-681, 2016.
75. HUGHSON, F. M., WRIGHT, P.E., BALDWIN, R. L. Structural Characterization of a Partly Folded Apomyoglobin Intermediate. **Science**, v. 249, p. 1544-1548, 1990.
76. JAVAHERIAN, K.; BEYCHOK, S. Subunit Interactions in the Conformational Change of Horse Apohemoglobin on Binding of Hemin. **Journal of Molecular Biology**, v.37, p.1-11, 1968.
77. PARUL, D.A.; BOKUT, S.B.; MILYUTIN, A.A.; PETROV.E.P.; NEMKOVICK, N.A.; SOBCHUK, A.N. Time-resolved fluorescence reveals two binding sites of 1,8-ANS in intact human oxyhemoglobin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 58, p.156-162, 2000.
78. HAWE, A.; POOLE R.; JISKOOT, W. Misconceptions over Forster resonance energy transfer between proteins and ANS/bis-ANS: Direct excitation dominates dye fluorescence. **Analytical Biochemistry**, v. 401, p. 99-106, 2010.
79. SARKAR, P.; BHARILL, S.; GRYCZYNSKI, I.; GRYCZYNSKI, Z.; NAIR, M.P.; LACKO, A.G. Binding of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate to lecithin: cholesterol acyltransferase studied by fluorescence techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 92, p. 19-23, 2008.
80. KINOSITA, K.; MITAKU, S; IKEGAMI, A. Degree of dissociation apohemoglobin studied by nanosecond fluorescence-polarization technique. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 393, p. 10-14, 1975