José Wilson Pires Carvalho

**Estudo da estabilidade térmica da hemoglobina extracelular gigante de
Glossoscolex paulistus (HbGp): efeitos do estado de oxidação do ferro do grupo
heme, pH e presença de surfactante**

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

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

São Carlos – SP

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde citada à fonte.

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Carvalho, José Wilson Pires

Estudo da estabilidade térmica da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp): efeitos do estado de oxidação do ferro do grupo heme, pH e presença de surfactante./José Wilson Pires Carvalho. -- São Carlos, 2013.

106 p.

Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos /Universidade de São Paulo, 2013.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

1. *Glossoscolex paulistus*. 2. Estabilidade térmica. 3. Surfactante aniônico. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

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

Agradecimentos

Agradeço!

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

Ao Professor Marcel Tabak por sua orientação e pelos laços de amizade e respeito que se formaram nesta convivência e também pela oportunidade de poder desenvolver esse trabalho;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado;

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

Às minhas tias Eva (segunda mãe), Maria da Guia e Raimunda Teresa e os primos (as) Rita de Kássia, Karla Karolina, Raiza, Rairone, Railson, Amanda e Constância pelo apoio e carinho que sempre me motiva;

Aos meus amigos de laboratório Adriano, Fernanda, Ana Eliza, Diógenes e Ezer Biazin, pelo apoio moral e pela contribuição direta e indireta na minha formação e neste trabalho. Obrigado em especial a vocês Adriano e Ezer Biazin;

Aos meus amigos Orlando, Ana Célia, Adriane, Washington, Alexandre, Tairo, Adriana, Elenice, Jairo e Edvan pelas discussões bem humoradas e pela amizade;

Aos professores Dr.(a) (s) Leandro R. S. Barbosa (IF-USP), Rosângela Itri (IF-USP), Patrícia S. Santiago (UNESP- Registro), Carlos Ernesto Garrido Salmon (USP-Ribeirão Preto) e Tatiana Batista (UEL-PR) pelas discussões e colaborações durante meu curso de doutorado, que foi muito importante para minha formação;

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

A Andressa Patrícia Alves Pinto, técnica do laboratório de biofísica do IFSC por toda ajuda nos experimentos de CD que foi muito importante para o bom desenvolvimento deste trabalho;

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em especial ao Dr. Mateus Cardoso, coordenador da linha SAXS2, pelo auxílio na realização das medidas de SAXS;

Ao pessoal da pós-graduação, Sílvia, Andréia e Gustavo, por toda a atenção, carinho e pelos bons serviços prestados;

A dona Suely e seu José de Ribamar pelos conselhos e apoio nos momentos difíceis.

Resumo

A hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) possui estrutura oligomérica composta por 144 cadeias globínicas e 36 cadeias linkers, que não possuem heme, formando uma bicamada hexagonal. Estudos mostraram que a HbGp possui uma alta estabilidade á variação de pH e presença de agentes desnaturantes, tais como, surfactantes e ureia, a 25°C. Com esses conhecimentos prévios, o presente estudo tem por objetivo avaliar a estabilidade térmica da HbGp 0,5-3,0 mg/mL, nas formas oxi-, meta- e cianometa-, em diferentes valores de pH. O efeito do SDS na estabilidade térmica da oxi-HbGp 0,5 e 3,0 mg/mL, em função do pH, será investigado também. Esses estudos foram realizados usando as técnicas de absorção óptica, dicroísmo circular (CD), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). Os resultados de absorção óptica e CD revelam que o processo de desnaturação da oxi- e cianometa-HbGp, no pH 7,0, envolve a formação das espécies oxidadas aquo-meta-HbGp e hemicromo. O processo de desnaturação é próximo ao modelo de dois estados, com uma temperatura crítica (T_c) de 58-59 °C. No pH ácido, a proteína agrega a partir de 58 °C. A cinética de agregação da oxi-HbGp, no pH 7,0, é dependente da concentração de proteína e da temperatura. Os dados de DLS mostram que a meta- e cianometa-HbGp 0,5 mg/mL, pH 7,0, desnaturam a 48 ± 1 e 56 ± 1 °C, respectivamente. Em pH alcalino, a proteína dissocia parcialmente antes de desnaturar, e o aumento da concentração de proteína faz aumentar o valor de T_c para a cianometa-HbGp. Dados de SAXS mostram que a oxi- e meta-HbGp, pH 7,0, desnaturam a 60 °C, apresentando valores de $R_g=143\pm1$ Å e $D_{max}=450\pm1$ Å, enquanto que a cianometa-HbGp se mantém estável, com valores de $R_g=107\pm1$ Å e $D_{max}=300\pm1$ Å. As análises das curvas $p(r)$ mostram uma porcentagem crescente de dodecâmero e tetrâmero em solução, em relação à fração de proteína íntegra e de subunidades maiores, com o aumento do pH e da temperatura. As análises baseadas no programa OLIGOMER são similares às baseadas na função $p(r)$. A presença do SDS induz a dissociação da oxi-HbGp 0,5 mg/mL pH 7,0. Entretanto, com 3,0 mg/mL de proteína a dissociação é parcial, com a sobreposição dos processos de dissociação, desnaturação e agregação, com o aumento da temperatura. No pH 5,0, o SDS promove a agregação da oxi-HbGp em temperaturas menores. As constantes cinéticas de dissociação da oxi-HbGp 0,5 mg/mL, pH 7,0 aumentam de $(0,53\pm0,07)\times10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para $(2,1\pm0,2)\times10^{-4} \text{ s}^{-1}$ na presença de 0,4 e 0,6 mmol/L de SDS a 40 °C, respectivamente. Na temperatura de 42 °C a constante aumenta 2,6 vezes, com 0,6 mmol/L de SDS, comparada a 40 °C. A oxi-HbGp 3,0 mg/ml na presença de 0,6 mmol/L de SDS, dissocia parcialmente em tempos menores com o aumento da temperatura antes de agregar. Portanto, esses estudos mostram que a estabilidade térmica da HbGp é sensível ao aumento de pH e presença de SDS. A ordem de estabilidade térmica em pH alcalino é dado por: cianometa->oxi->meta-HbGp.

Alem disso, o processo de desnaturação é governado pelo valor do pH e dependente da concentração de proteína em solução.

Palavras-chaves: Hemoglobina extracelular, HbGp, absorção óptica, CD, DLS, SAXS, temperatura, pH

Abstract

The extracellular hemoglobin *Glossoscolex paulistus* of (HbGp) has an oligomeric structure composed by 144 globin chains and 36 non globin chains (named linkers), forming a hexagonal bilayer. HbGp presents a high stability regarding pH variation and the presence of denaturing agents, such as, for example, urea and surfactant, at 25°C. In this way, the present studies aim to evaluate the thermal stability for oxy-, meta- and cyanomet-HbGp 0.5-3.0 mg/ml, at different pH values. The SDS effect on the thermal stability of oxy-HbGp 0.5 and 3.0 mg / mL is also investigated. Optical absorption, circular dichroism (CD), dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) techniques were employed for these studies. The results based on the optical absorption and CD spectroscopies show that the denaturation process for oxy- and cyanomet-HbGp, at pH 7.0, involves the formation of oxidized species, such as aquo-met-HbGp and hemichrome. This denaturation process is very close to a two-state model, with a critical temperature (T_c) of 58-59 °C. However, in the acidic pH, the aggregation of protein occurs at 58 °C. The aggregation process kinetics for oxy-HbGp, pH 7.0, is dependent on the protein concentration and temperature. DLS data show that meta- and cyanomet-HbGp, 0.5 mg/mL, pH 7.0, undergo denaturation at 48 ± 1 and 56 ± 1 °C, respectively. At alkaline pH, two HbGp forms undergo partial dissociation before denaturation, and at higher protein concentration, an increase of T_c values for cyanomet-HbGp is observed. SAXS results show that the denaturation of oxy- and met-HbGp occur at 60 °C, presenting $R_g=143\pm1$ Å and $D_{max}=450\pm15$ Å, while cyanomet-HbGp remains stable with $R_g=107\pm1$ Å and $D_{max}=300\pm10$ Å, at this temperature. The p(r) curves analysis show the increase of dodecamer and tetramer percentages in solution, with increase of pH and temperature. The results using the OLIGOMER program are similar to the p(r) data analysis. For oxy-HbGp 0.5 mg/mL pH 7.0, in the presence of SDS, oligomeric dissociation before denaturation is observed. However, with 3.0 mg/ml of protein the dissociation process is slower, showing an overlap of the dissociation, denaturation and aggregation processes in the system, with increase of temperature. At pH 5.0, SDS promotes the aggregation of oxy-HbGp at lower temperatures, as compared to the absence of surfactant. The kinetic dissociation constant values for oxy-HbGp 0.5 mg/mL increase from $(0.53 \pm 0.07) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ to $(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, in the presence of 0.4 and 0.6 mmol/L SDS at 40 °C, respectively. At 42 °C the dissociation constant value increases 2.6-fold, with 0.6 mmol/L SDS, as compared to 40 °C. For oxy-HbGp 3.0 mg/ml, in the presence of 0.6 mmol/L SDS, the oligomeric dissociation is smallest occurring in shorter times with increasing temperature before aggregation. Therefore, these studies show that the thermal stability of HbGp is sensitive to the pH variation and the presence of SDS. At alkaline pH, the order of thermal stability is the following: cyanomet->oxy-

>met-HbGp. Furthermore, the denaturation process is governed by the pH value, being dependent on the protein concentration in solution.

Keywords: Extracellular hemoglobin, HbGp, optical absorption, CD, DLS, SAXS, temperature, pH

Lista de figuras

- Figura 1:** Representação esquemática da estrutura da hemoglobina humana (A) e estrutura do grupo heme (B) (figura adaptada da referência [1]).20
- Figura 2:** Representação esquemática da hierarquia da estrutura oligomérica da HbGp, obtida por estudos cristalográficos. A estrutura da HbGp íntegra (A) é composta por doze protômeros (B), cada um deles contendo uma estrutura de globinas dodecamérica, e três subunidades sem grupo heme (linkers), $(abcd)_3L_3$. A estrutura dodecamérica (C) é composta por quatro tipos de cadeias de globina: a , b , c e d . As quatro cadeias globinas estão associados como um hetero-tetrâmero (D), onde a , b , e c formam um trímero, com os monômeros ligados por ligações dissulfeto [3].21
- Figura 3:** (A) Estrutura química do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) , do inglês sodium dodecyl sulfate) e, (B) catiônico, cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), do Inglês (cetyltrimethylammonium chloride)22
- Figura 4:** Representação esquemática das mudanças no estado de oxidação e na sexta coordenação do ferro do grupo heme para a oxi-HbGp, quando essa hemoglobina gigante sofre dissociação oligomérica.....23
- Figura 5:** Anelídeo *Glossoscolex paulistus* após ter sido anestesiado em atmosfera de éter etílico.29
- Figura 6:** Representação esquemática dos passos para a obtenção das formas oxidadas meta- e cianometa-HbGp, partindo da forma oxi-HbGp. (A) oxi-, (B) meta- e (C) cianometa-HbGp.30
- Figura 7:** Espectros de absorção óptica para oxi- e cianometa-HbGp, 0,2 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L. Oxi-HbGp (A) pH 7,0 e (B) pH 5,0, cianometa-HbGp (C) pH 7,0 e (D) pH 5,0, nas temperaturas indicadas. Nos insertos a região das bandas-Q ampliadas é mostrada.....45
- Figura 8:** Valores do deslocamento λ_{max} e da absorbância para a oxi- e cianometa-HbGp 0,2 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L, em função da temperatura nos valores de pH indicados. (A) e (B) Oxi-HbGp, e (C) e (D) cianometa-HbGp. (E) Valores de absorbância para oxi- (415 nm) e cianometa-HbGp (420 nm), no pH 7,0, em função da temperatura, ajustada com base no modelo de dois estados, (equação 12). Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas cheias aos ajustes. ΔH_{app} é a variação de entalpia aparente e T_c a temperatura crítica de desnaturação, ambos obtidos dos ajustes mostrados.....47
- Figura 9:** Espectros de dicroísmo circular (CD) para oxi-HbGp, no pH 7,0, (A); na região das ligações peptídicas 0,2 mg/mL e (B) região do grupo heme 3,0 mg/mL. (C) Valores de elipticidade em 222 nm, para oxi-HbGp, em função da temperatura, nos valores de pH indicados, ajustada com

um modelo de dois estados. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas cheias aos ajustes usando a equação 12.	49
Figura 10: Valores de elipticidade para (A) oxi- (415 nm) e (B) cianometa-HbGp (420 nm), 3,0 mg/mL, em tampão fosfato 30mmol/L, em função da temperatura, nos valores de pH indicados. ..	50
Figura 11: Curvas de distribuição de tamanho baseados na intensidade de espalhamento (%) para oxi-HbGp 1,0 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L pH 7,0. (A) 50 °C e (B) 54 °C, em diferentes tempos de incubação.	53
Figura 12: Curvas de diâmetro hidrodinâmico e intensidade de espalhamento em função do tempo para a cinética de agregação térmica da oxi-HbGp, em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,0. Concentração de proteína (A), (B) e (E) de 1,0 mg/mL e (C) e (D) 3,0 mg/mL. (A) e (C) diâmetro hidrodinâmico, D_h nm, e (B) e (D) intensidade de espalhamento. (E) ajustes de D_h (nm) obtidos usando a equação 14, para obtenção dos parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 2.	54
Figura 13: Curvas de “melting” para meta-HbGp, na faixa de concentração 0,5 a 3,0 mg/mL, em acetato-fosfato-borato 30 mmol/L, na faixa de temperatura de 25 a 70 °C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 7,5 e (D) pH 8,0.	56
Figura 14: Curvas de SAXS para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL: (A) pH 7,0, (C), pH 5,0 e (E), pH 8,0. Os símbolos correspondem as curvas experimentais e as linhas aos ajustes usando o programa GNOM. Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$: (B) pH 7,0, (D) pH 5,0 e (F) pH 8,0, correspondentes aos ajustes mostrados em (A), (C) e (E), respectivamente.	60
Figura 15: Curvas de SAXS para a cianometa-HbGp 3,0 mg/mL: (A) pH 5,0, (C), pH 7,0 e (E), pH 9,0. Os símbolos correspondem às curvas experimentais e as linhas aos ajustes obtidos usando o programa GNOM. Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$: (B) pH 5,0, (D) pH 7,0 e (F) pH 9,0, correspondentes aos ajustes mostrados em (A), (C) e (E), respectivamente.	62
Figura 16: Curvas de SAXS para a meta-HbGp 3,0 mg/mL: (A) pH 7,0 e (C), pH 8,0. Os símbolos correspondem às curvas de espalhamento experimentaia e as linhas aos ajustes usando o programa GNOM. Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$: (B) pH 7,0 e (D) pH 8,0, correspondentes aos ajustes mostrados em (A) e (C), respectivamente.	64
Figura 17: Curvas teóricas de SAXS, obtidas usando o programa CRY SOL [32], e baseados na estrutura cristalográfica da HbLt, depositada no PDB código 2GTL[8]. (A) Curvas de SAXS para a proteína íntegra e fragmentos com maior peso molecular e (B) para os fragmentos com menor peso molecular. Os insertos em (A) e (B) correspondem às funções de distribuição de distâncias $p(r)$ correspondentes, obtidas usando o programa GNOM, das respectivas curvas de SAXS em (A) e (B).	67

- Figura 18:** Curvas da função de distribuição $p(r)$ e de intensidade $I(q)$ (curvas de SAXS) experimentais para a HbGp, em diferentes estados de oxidação, pH e temperatura. As curvas $p(r)$ experimentais foram obtidas usando o programa GNOM. Os ajustes mostrados junto com a $p(r)$ experimental foram realizados com a combinação linear das curvas de $p(r)$ teóricas obtidas para a estrutura cristalográfica da HbLt, mostradas na Figura 15. (A) oxi- HbGp pH 7,0 a 20°C, (B) pH 8,0 a 60°C, (C) Cianometa-HbGp pH8,0 a 60°C e (D) pH 9,0 a 50 °C, (E) meta-pH 8,0 a 30 °C. Nos insertos são mostradas as curvas experimentais de SAXS para HbGp (símbolos) e o ajuste usando o programa OLIGOMER (linha contínua).68
- Figura 19:** Curvas de “melting” para a oxi-HbGp, na concentração de 0,5 mg/mL, em fosfato-acetato 30 mmol/L, na presença de SDS, na faixa de temperatura de 20 a 70 °C. (A) pH 7,0 e (B) pH 5,0.....73
- Figura 20:** Curvas de SAXS para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, pH 7,0, na presença de (A) 0,2 e (C) 0,4 mmol/L de SDS. (B) e (D) Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$, correspondentes aos ajustes das curvas mostradas em (A) e (B), obtidas usando o programa GNOM.....77
- Figura 21:** Curvas de SAXS para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, pH 5,0, na presença de 0,2 (A) e 0,4 (C) mmol/L de SDS. (B) e (D) Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$, correspondentes aos ajustes das curvas mostradas em (A) e (B), obtidas usando o programa GNOM.....79
- Figura 22:** Curvas de SAXS para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, pH 9,0, na presença de 0,2 (A) e 0,4 (C) mmol/L de SDS. (B) e (D) Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$, correspondentes aos ajustes das curvas mostradas em (A) e (B), obtidas usando o programa GNOM.....81
- Figura 23:** Gráficos de Kratky para a oxi-HbGp, em diferentes temperaturas, em tampão fosfato-borato-acetato 20 mmol/L, na presença de 0,2 e 0,4 mmol/L de SDS. (A) e (B) pH 7,0, (C) e (D) pH 5,0, e (E) e (F) pH 9,0, respectivamente, nas temperaturas indicadas.82
- Figura 24:** Curvas de distribuição de tamanho para a oxi-HbGp 0,5 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L pH 7,0, a 40 °C. (A) 0,2, (B) 0,4 e (C) 0,6 mmol/L de SDS. As setas indicam o começo da dissociação (Figs. B e C), respectivamente.....84
- Figura 25:** Dissociação oligomérica da oxi-HbGp 0,5 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L pH 7,0, na presença de SDS, a 40 (Figs. A e B) e 42 °C (Figs. C e D).86
- Figura 26:** Dissociação oligomérica da oxi-HbGp 3,0 mg/mL, tampão fosfato 30 mmol/L pH 7,0, na presença de 0,6 mmol/L de SDS, nas temperaturas indicadas.88

Lista de tabelas

Tabela 1: Valores de temperatura crítica (T_c) e variação de entalpia aparente (ΔH_{app}), para a oxi- e cianometa-HbGp, obtidos usando dados de CD na região das ligações peptídicas (222 nm) e na região do grupo heme (415 e 420 nm), nos valores de pH indicados.	52
Tabela 2: Parâmetros hidrodinâmicos e cinéticos para o processo de agregação para a oxi-HbGp, em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,0, em diferentes concentrações de proteína e temperaturas. ..	55
Tabela 3: Valores de diâmetro hidrodinâmico e temperatura crítica, associados ao processo de desnaturação térmica da meta- e cianometa-HbGp, nas concentrações de proteína e valores de pH indicados. Esses parâmetros foram obtidos através das curvas de “melting” mostradas na Figura 11.	58
Tabela 4: Valores de R_g (Å), D_{max} (Å) e $I(0)$ (a.u.) para a oxi-HbGp, obtidos através do programa GNOM nos valores de pH indicados.	61
Tabela 5: Valores de R_g (Å), D_{max} (Å) e $I(0)$ (a.u.) obtidos usando o programa GNOM para a cianometa-HbGp, nos valores de pH indicados.	63
Tabela 6: Valores de R_g (Å), D_{max} (Å) e $I(0)$ (a.u.), para meta-HbGp obtidos usando o programa GNOM, nos valores de pH indicados.	65
Tabela 7: Porcentagem de contribuição dos fragmentos (subunidades) obtidos pelo ajuste da $p(r)$ experimental da HbGp, pela combinação linear das curvas $p(r)$ teóricas e usando o programa OLIGOMER, para a oxi-, cianometa- e meta-HbGp nas temperaturas indicadas. Os ajustes são mostrados na Figura 18.	70
Tabela 8: Valores do diâmetro hidrodinâmico (D_h) e temperaturas de dissociação e desnaturação, para a oxi- e cianometa-HbGp no pH 7,0 e 5,0, nas concentrações de SDS indicadas.	74
Tabela 9: Valores de R_g (Å), D_{max} (Å) e $I(0)$ (a.u.) para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, obtidos usando o programa GNOM, nas concentrações de SDS e temperaturas indicadas.	78
Tabela 10: Parâmetros cinéticos para o processo de dissociação oligomérica da oxi-HbGp 0,5 mg/mL, pH 7,0, nas concentrações de SDS e temperaturas indicadas	87

Lista de abreviações e símbolos

HbGp- Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*;

Oxi-HbGp- Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* com o ferro do grupo heme no estado reduzido (Fe^{+2}) com a coordenação ocupada por uma molécula de O_2 ;

Cianometa-HbGp- Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* com o ferro do grupo heme no estado oxidado (Fe^{+3}) com a sexta coordenação ocupada pelo ligante cianeto (CN^-);

Meta-HbGp- Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* com o ferro do grupo heme no estado oxidado (Fe^{+3}) com a sexta coordenação ocupada por uma molécula de H_2O ;

pI- ponto isoelétrico da proteína; do Inglês “*Isoelectric point*”;

HbLt- Hemoglobina extracelular de *Lumbricus terrestris*;

DSC-Calorimetria diferencial de varredura do Inglês “*Differential scanning calorimetry*”

CD- Dicroísmo circular; do Inglês “*Circular dichroism*”;

DLS- Espalhamento de luz dinâmico; do Inglês “*Dyanamic light scattering*”

D_h - Diâmetro hidrodinâmico;

SAXS- Espalhamento de raio X a baixo ângulo; do Inglês “*Small-angle X-ray scattering*”;

R_g- Raio de giro da partícula;

D_{max}- Dimensão máxima da partícula (Å);

I(0)- Intensidade de espalhamento de raio X da partícula quando q é igual a zero;

SDS- Dodecil sulfato de sódio; do Inglês “*Sodium dodecil sulfate*”

CTAC- Cloreto de cetiltrimetilamônio; do Inglês “*cetyltrimethylammonium chloride*”

12(abcd)₃L₃- Estequiometria para a estrutura íntegra da HbGp e HbLt;

6(abcd)₃L₃- Uma metade da bicamada hexagonal da HbGp e HbLt;

(abcd)₃L₃- Dodecâmero de cadeias globinicas mais três cadeias *linkers* (protômero);

(abcd)₃- Dodecâmero;

(abcd)- Tetrâmero;

(abc)- Trímero;

(d)- Monômero *d*;

D_z- Coeficiente de difusão média das moléculas de proteína em solução;

D_p-Coeficiente de difusão da proteína íntegra no início;

D_∞-Coeficiente de difusão médio de todas as espécies dissociadas em solução no limite de tempo longo (infinito);

D_{h,0}- Diâmetro hidrodinâmico da proteína antes no início do processo de agregação;

t_0 - “Lag period” tempo requerido para o processo de agregação da proteína seja iniciado;

t_{2D} - Tempo necessário para que o valor do diâmetro hidrodinâmico seja duplicado;

Sumário

CAPÍTULO 1.....	18
1.0 Introdução.....	19
1.1 Proteínas.....	19
1.2 Hemoglobina extracelular de <i>Glossoscolex paulistus</i> (HbGp).....	20
1.3 Surfactantes iônicos.....	21
1.4 Estudos de interação da hemoglobina extracelular de <i>Glossoscolex paulistus</i> (HbGp) com os surfactantes iônicos, dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC) a temperatura ambiente	23
1.5 Estabilidade térmica da hemoglobina extracelular de <i>Glossoscolex paulistus</i> (HbGp).....	24
CAPÍTULO 2.....	26
2.0 Objetivos.....	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
CAPÍTULO 3.....	28
3.0 Materiais e métodos	29
3.1 Extração e purificação da hemoglobina de <i>Glossoscolex paulistus</i> (HbGp)	29
3.2 Preparação das formas oxidadas, meta- e cianometa-HbGp	29
3.3 Medidas de absorção óptica, dicroísmo circular (CD), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e espalhamento de raio X a baixo ângulo (SAXS)	30
3.3.1 Análises dos dados de absorção óptica e dicroísmo circular (CD)	32
3.3.2 Análises dos dados de cinética de dissociação oligomérica da oxi-HbGp, no pH 7,0, na presença de SDS, em diferentes temperaturas, monitorada por DLS	35
3.3.3 Análises dos dados de cinética de agregação da oxi-HbGp, pH 7,0, em diferentes temperaturas, monitorada por DLS	36
3.3.4 Análises dos dados de SAXS	36
3.4- Técnicas de estudo.....	37
3.4.1 Absorção óptica no UV-VIS.	37
3.4.2 Dicroísmo circular (CD).....	39
3.4.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	40
3.4.4 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	41
CAPÍTULO 4.....	43
PARTE 1-ESTABILIDADE TÉRMICA DA OXI-, META- E CIANOMETA-HBGP, EM MEIO ÁCIDO, NEUTRO E ALCALINO.....	44
4.0 Resultados e discussões	45
4.1 Estabilidade térmica da oxi- e cianometa-HbGp, em pH ácido e neutro, monitorada por absorção óptica.	45

4.2 Estabilidade térmica da oxi- e cianometa-HbGp, em meio ácido e neutro, monitorada por dicroísmo circular (CD)	48
4.3 Estudos da cinética de agregação da oxi-HbGp em diferentes valores de temperatura e concentração de proteína, no pH 7,0, monitorando o diâmetro hidrodinâmico por DLS	52
4.4 Efeito da concentração de proteína na estabilidade térmica da meta- e cianometa-HbGp, em função do pH	56
4.5 Estabilidade térmica da oxi-, meta- e cianometa-HbGp, em pH ácido, neutro e alcalino monitorada por espalhamento de raio-x a baixo ângulo (SAXS)	59
4.5.1 oxi-HbGp	59
4.5.2 Cianometa-HbGp	61
4.5.3 Meta-HbGp	64
4.6 Análises da dissociação oligomérica da oxi-, meta- e cianometa-HbGp, em diferentes valores de pH e temperatura	65
PARTE 2- ESTABILIDADE TÉRMICA DA OXI-HBGP NA PRESENÇA DO SURFACTANTE ANIÔNICO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS).....	72
4.7 Estabilidade térmica da oxi-HbGp, na presença de SDS, em pH ácido e neutro, monitorada por espalhamento dinâmico de luz (DLS)	73
4.7.1 pH 7,0.....	73
4.7.2 pH 5,0.....	75
4.8 Estabilidade térmica da oxi-HbGp, na presença de SDS, em pH ácido, neutro e alcalino, monitorada por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	76
4.8.1 pH 7,0.....	76
4.8.2 pH 5,0.....	78
4.8.3 pH 9,0.....	80
4.9 Análises pelo gráfico de Kratky para oxi-HbGp, na presença de SDS, em diferentes valores de temperatura e pH.....	81
4.10 Dissociação oligomérica da oxi-HbGp no pH 7,0, na presença de SDS, em diferentes temperaturas, monitorada por DLS.	83
CAPÍTULO 5.....	89
5.0 Conclusões	90
6.0 Perspectivas	92
7.0 Referências	93
8.0 APÊNDICE	99
8.1 Artigos relacionados com tese	99
8.1.1 Artigo I	99
8.1.2 Artigo II.....	100
8.1.3 Artigo III	101
8.2 Outras publicações durante o doutorado	102

8.2.1 Artigo I	102
8.2.2 Artigo II.....	103
8.2.3 Artigo III	104
8.2.3 Capítulo de livro I	105
8.2.4 Capítulo de livro II	106

Capítulo 1

Introdução

Neste capítulo é apresentada uma descrição das características estruturais e funcionais das proteínas e da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp), assim como, dos principais estudos já realizados com essa hemoglobina. Os estudos descritos nessa secção foram realizados com a HbGp, em diferentes valores de pH, concentração de proteína, temperatura e presença de surfactante, a 25°C.

1.0 Introdução

1.1 Proteínas

As proteínas são uma classe de biomoléculas que desempenham diferentes atividades biológicas, tais como a defesa, catálise, proteção, transporte, entre outras, em vários sistemas de organismos vivos, [1,2]. Dentro dessa numerosa classe de proteínas encontram-se as hemoglobinas que são responsáveis pelo transporte de moléculas como o oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) entre os pulmões e os tecidos, uma função que é essencial ao funcionamento do organismo. Um exemplo de hemoproteína bastante estudada é a hemoglobina humana e o citocromo *c*, que possuem elevada especificidade de funções, numa grande variedade de seres vivos [1,2]. Apesar de amplamente estudadas, as hemoproteínas ainda permanecem intrigantes sob vários aspectos físico-químicos [1,2].

A estrutura das hemoproteínas possui dois domínios químicos distintos, as cadeias polipeptídicas, e o grupo heme (Fig. 1A). O grupo heme é constituído por uma protoporfirina (parte orgânica) e um átomo de ferro central (parte inorgânica) coordenado a quatro átomos de nitrogênio do macrociclo protoporfirínico (Fig. 1B). O ferro do grupo heme é o responsável pela coloração marrom avermelhada característica das hemoproteínas em solução aquosa [1,2]. Ele está localizado na globina dentro de uma cavidade proteica denominada de “bolsão hidrofóbico” onde o átomo de ferro se encontra ligado aos quatro anéis pirrólicos do macrociclo numa conformação coplanar [1,2].

No desenvolvimento da sua função fisiológica, que é o transporte de oxigênio de forma efetiva e eficiente, a hemoglobina possui grande afinidade pelo O_2 nos pulmões, e quando chega aos tecidos essa afinidade diminui drasticamente, liberando a molécula de oxigênio facilmente [1,2]. Esse mecanismo de afinidade da hemoglobina pelo O_2 é regulado pelo pH sanguíneo e a saturação de oxigênio. Nos pulmões o pH do sangue é mais básico (pH=7,6) e a saturação de oxigênio é máxima, enquanto que, nos tecidos o pH é um pouco mais ácido (pH=7,2), e a pressão é mais baixa, e consequentemente a afinidade é menor. Além disso, a hemoglobina liga o O_2 de forma cooperativa, de forma que, a ligação de uma molécula de O_2 em um dos grupos heme dos quatro monômeros do tetrâmero facilita a ligação de outras moléculas de O_2 nos demais hemes (Fig. 1A). Da mesma forma, a liberação também ocorre de forma cooperativa: a liberação de uma molécula de O_2 facilita a liberação das demais moléculas dos outros três monômeros (Fig. 1A, [1,2]). Assim,

essas propriedades intrínsecas das hemoproteínas relacionadas à sua estrutura-atividade, tornam viável a vida aeróbica [1,2].

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da hemoglobina humana (A) e estrutura do grupo heme (B) (figura adaptada da referência [1]).

Fonte: Voet, D.; Voet, J.G. **Bioquímica**. Porto Alegre. Artemed, 2006. Tradução de A.B.G. da Veiga. et all. 3ª ed. 1616 p.

1.2 Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp)

A hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) apresenta uma estrutura oligomérica altamente organizada, composta por 144 cadeias polipeptídicas com grupo heme (globinas) e 36 cadeias polipeptídicas sem grupos heme, que são chamadas de cadeias *linkers* (*L*), com uma massa molecular total de 3,6 MDa [3-5]. A estrutura oligomérica da HbGp é formada por dois discos hexagonais, sobrepostos formando uma bicamada hexagonal (Fig. 2A). A dissociação dessa estrutura pode dar origem a doze unidades de massa molecular 1/12 da molécula íntegra, de cerca de 300 kDa (Figs. 2B e 2C, [3,6]). Essas estruturas por sua vez, são compostas por quatro subunidades, globinas, denominadas de cadeias *a*, *b*, *c* e *d*, sendo que *a*, *b* e *c* estão ligadas por ligação dissulfeto formando um heterotrímero (*abc*) e a subunidade *d* mantém-se por ligações não covalentes (Fig. 2D [3,6]). Além destas quatro subunidades que contêm o grupo heme, a HbGp possui três cadeias polipeptídicas distintas que não tem grupo heme, denominadas de linkers (*L* Fig. 2B). O papel das subunidades linkers está provavelmente relacionado com a manutenção da estrutura íntegra na forma de bicamada hexagonal [7-9].

A HbGp possui estrutura oligomérica semelhante à da hemoglobina extracelular de *Lumbricus terrestris* (HbLt), que vem sendo estudada por vários grupos de pesquisadores, e possui

a estrutura cristalográfica resolvida [3-10]. De acordo com o modelo de Vinogradov [11] essas hemoglobinas gigantes seguem a estequiometria $12(abcd)_3L_3$ para a estrutura íntegra. A similaridade entre HbGp e HbLt está baseada em estudos espectroscópicos, hidrodinâmicos e cristalográficos [5-20]. Estudos por MALDI-TOF-MS, por exemplo, com as subunidades da HbGp confirmam essa similaridade com a HbLt, através de comparação das massas das diferentes subunidades. Observado que o monômero *d* possui uma massa molecular (MM) em torno de 16,6 kDa, o trímero *abc* apresenta MM de 52 kDa, e as cadeias linkers tem MM na faixa de 26-32 kDa. Esses valores são similares àqueles reportados para a HbLt [3,5,6,11,12]. Estudos com a HbLt sugerem que a unidade funcional no processo de oxigenação é o dodecâmero, devido a que essa estrutura apresenta coeficiente de Hill similar à estrutura íntegra [2,16,17].

Figura 2: Representação esquemática da hierarquia da estrutura oligomérica da HbGp, obtida por estudos cristalográficos. A estrutura da HbGp íntegra (A) é composta por doze protômeros (B), cada um deles contendo uma estrutura de globinas dodecamérica, e três subunidades sem grupo heme (linkers), $(abcd)_3L_3$. A estrutura dodecamérica (C) é composta por quatro tipos de cadeias de globina: *a*, *b*, *c* e *d*. As quatro cadeias globinas estão associados como um hetero-tetrâmero (D), onde *a*, *b*, e *c* formam um trímero, com os monômeros ligados por ligações dissulfeto [3].

Fonte: TABAK, M.; CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; BACHEGA, J. F. R.; SANTIAGO, P.S. Recent new characterizations on the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* and some other giant hemoglobins from different worms. In: INNOCENTIN, A. (Ed.) **Stoichiometry and research** – the importance of quantity in Biomedicine. Rijeka, Croatia: In Tech, 2012. v.1, p.337-356.

1.3 Surfactantes iônicos

Os surfactantes são compostos que possuem estrutura química composta por duas partes distintas, uma parte carbônica apolar e um grupo carregado polar. A parte apolar é formada por uma

cadeia carbônica alifática ou aromática, que é pouco solúvel em água, e a parte polar corresponde a grupos carregados, que podem ser o grupo fosfato, amino, sulfato e carboxil [21]. Os surfactantes são compostos que formam estruturas organizadas espontaneamente em solução aquosa, conhecidas como micelas. O tamanho e a forma das micelas depende de alguns fatores, tais como o pH, temperatura, tamanho da cadeia carbônica, concentração, força iônica do meio, entre outros [21]. Em baixas concentrações os surfactantes mantêm-se na forma monomérica em solução; quando em altas concentrações eles formam micelas. A concentração mínima de surfactante requerida para que haja formação das primeiras micelas é denominada concentração micelar crítica (cmc), que varia de acordo com o tamanho da cadeia carbônica, tipo de carga e condições de meio, como a presença de sal e outras substâncias [21]. Na micela as estruturas hidrofóbicas, ou seja, as cadeias carbônicas do surfactante fazem contato entre si e os grupos polares interagem com o solvente aquoso na superfície.

A classificação dos surfactantes é feita de acordo com o tipo de carga presente na parte hidrofílica e pelo tamanho da cadeia hidrofóbica ou carbônica. Dessa forma, eles podem ser aniônico, catiônico ou zwitteriônico. Na Figura 3 são mostradas as estruturas químicas dos surfactantes, aniônico, dodecil sulfato de sódio (SDS) e, catiônico, cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC).

Estudos da interação proteína-surfactante na área de biofísica molecular são frequentes, visando à obtenção de informações relacionadas à estrutura e atividades de proteínas principalmente as globulares. Esses estudos de interação proteína-surfactante constituem uma abordagem interessante, e de grande relevância interdisciplinar, uma vez que, os surfactantes são largamente empregados em bioquímica e biotecnologia para a solubilização proteica, purificação e caracterização de proteínas. Desta forma, estudos da interação de proteínas com surfactantes, em várias faixas de concentração e pH, proporciona a obtenção de informação significativa a respeito do arranjo estrutural, de uma globina [19, 21-25].

Figura 3: (A) Estrutura química do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) , do inglês sodium dodecyl sulfate) e, (B) catiônico, cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), do Inglês (cetyltrimethylammonium chloride) .

Tanford, C. **The hydrophobic effect-formation of micelles and biological membranes**. John Wiley and Sons, New York, 1973. 233 p.

1.4 Estudos de interação da hemoglobina extracelular de Glossoscolex paulistus (HbGp) com os surfactantes iônicos, dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC) a temperatura ambiente

Estudos por absorção óptica, fluorescência e espalhamento de luz estático com a oxi-HbGp em pH 7,0, na presença de SDS, a 25 °C, mostram que o surfactante induz a dissociação oligomérica da macropoteína, em concentrações acima da concentração micelar crítica (cmc, [24]). Esse processo de dissociação oligomérica da HbGp é acompanhado pela formação de espécies oxidadas, tais como a meta-HbGp, o hemicromo e pentacoordenada (Fig. 4,[24]). Na forma nativa íntegra da oxi-HbGp, o ferro do grupo heme se encontra na forma reduzida, ou seja, no estado Fe^{+2} e a sexta coordenação do metal é ocupada por uma molécula de oxigênio (O_2 , Fig. 4A). Na meta-HbGp o ferro do grupo heme encontra-se oxidado Fe^{+3} e a sexta coordenação é ocupada por uma molécula de água (H_2O , Fig. 4B). No hemicromo o ferro também se encontra na forma oxidada e a sexta coordenação é ocupada pelo resíduo histidina distal, enquanto que, na forma pentacoordenada a sexta coordenação do metal se encontra momentaneamente desocupada (Figs. 4C e 4D).

Figura 4: Representação esquemática das mudanças no estado de oxidação e na sexta coordenação do ferro do grupo heme para a oxi-HbGp, quando essa hemoglobina gigante sofre dissociação oligomérica.

O processo de dissociação oligomérica da HbGp induzido por SDS, no pH 7,0, a 25 °C também foi estudado por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS, [19]). Esses estudos mostram que na ausência do surfactante, a curva de SAXS da HbGp apresenta três ombros em

valores de q iguais a $0,04 \text{ \AA}^{-1}$, $0,07 \text{ \AA}^{-1}$ e $0,12 \text{ \AA}^{-1}$. Esses ombros são característicos da proteína na forma enovelada (nativa). Além disso, a HbGp na forma não dissociada possui valores dos parâmetros estruturais raio de giro (R_g) e dimensão máxima ($D_{\max}$) de 107 e 300 $\text{\AA}$, respectivamente, [19]. Nesses estudos, observa-se que a oxi-HbGp começa a dissociar na concentração de SDS 2 mmol/L, com uma perda de intensidade da curva de SAXS, assim como, dos ombros característicos da forma íntegra. Na presença de 20 mmol/L de surfactante, a oxi-HbGp dissocia-se completamente sendo caracterizada por um R_g de 24 $\text{\AA}$ [19].

Estudos com o CTAC mostram que concentrações de surfactante na faixa entre 0,1 e 1 mmol/L, induzem a agregação da HbGp seguida pela re-dissolução dos agregados proteína-surfactante em concentrações maiores do surfactante [12,24]. Essa diferença de interação do SDS e CTAC com a HbGp é atribuída ao fato que acima do ponto isoelétrico ($pI=5,5$), no pH 7,0, a proteína encontra-se carregada negativamente. Nesse pH, a interação do CTAC que é catiônico com a HbGp, é mais forte mesmo em baixas concentrações, levando à neutralização parcial das cargas da proteína, e induzindo a formação de agregados [12,24]. Além disso, a interação dos surfactantes CTAC e SDS com a estrutura oligomérica da HbGp também foi estudada por MALDI-TOF-MS [12]. Neste estudo foi observado que até 10 moléculas de CTA^+ ligam-se à subunidade d . Entretanto, não são observadas evidências que o SDS liga-se a HbGp. Dessa forma, esses estudos não mostram claramente a ligação do SDS à HbGp, sugerindo que a interação HbGp-SDS é menos efetiva quando comparada à interação HbGp-CTAC [12].

1.5 Estabilidade térmica da hemoglobina extracelular de Glossoscolex paulistus (HbGp)

Estudos com variação de temperatura usando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostram que a oxi-HbGp, em pH 7,0, mantém-se estável até 52 $^{\circ}\text{C}$, com um diâmetro hidrodinâmico constante de 27 nm. Acima dessa temperatura, ocorre a desnaturação com a formação de agregados, com tamanhos em torno de 65 nm. No pH alcalino (valores de pH 8,0 e 9,0), a temperatura induz a dissociação oligomérica da HbGp em temperaturas próximas a 44 $^{\circ}\text{C}$, formando espécies com D_h de 10 nm, o que é consistente com o diâmetro da mistura de subunidades em solução, com a posterior desnaturação das mesmas em temperaturas maiores [13-15]. No meio ácido, a HbGp também é bastante estável sofrendo desnaturação térmica acima de 60 $^{\circ}\text{C}$, sendo a desnaturação acompanhada pela formação de agregados bem maiores de 260 a 3000 nm [13,14].

Além disso, estudos por calorimetria diferencial de varredura (DSC) mostram termogramas com uma única transição bem cooperativa e temperatura crítica de desnaturação de 60 °C, para a oxi-HbGp, no pH 7,0. Quando em meio alcalino (pH=8,0) a oxi-HbGp possui termograma com duas transições, em 50 e 58 °C, respectivamente. As duas transições sugere que a proteína sofre dissociação oligomérica antes da desnaturação, sendo a primeira transição atribuída ao processo de dissociação e a segunda a desnaturação das subunidades dissociadas [14,15]. Estudos por DSC também mostram que o processo de desnaturação térmica da HbGp é cineticamente controlado e dependente da concentração, ou seja, a medida que a razão de aquecimento e a concentração de proteína aumentam, a temperatura de desnaturação desloca-se para valores maiores. No meio ácido, a HbGp é consideravelmente mais estável sofrendo desnaturação térmica acima de 65 °C, sendo que o processo de desnaturação envolve o fenômeno de agregação [26]. Além disso, estudos de reversibilidade do processo de desnaturação térmica, utilizando DSC, mostram que a oxi-HbGp é parcialmente reversível no pH 7,0. Essa reversibilidade parcial deve-se a que, quando a HbGp é aquecida a 59 °C, e em seguida é resfriada a 25 °C, $64 \pm 5\%$ da proteína enovelada é restabelecida. Um segundo ciclo de aquecimento a temperaturas maiores que 59 °C leva a desnaturação da proteína de forma irreversível [26]. Os estudos prévios também mostram que temperatura crítica de desnaturação da oxi-HbGp é dependente da razão de aquecimento, uma vez que, o valor da temperatura crítica é deslocado de 58 para 62 °C, quando a razão de aquecimento é aumentada de 0,5 para 1,5 °C/min [15].

Embora, nos últimos anos, tenham sido realizados alguns estudos sobre a estabilidade oligomérica da HbGp, na presença de surfactante, a temperatura ambiente, e da estabilidade térmica em diferentes condições de pH [13,14,23,24], ainda são desconhecidos os efeitos da temperatura na estrutura secundária e terciária durante o processo de desnaturação. Estes efeitos sobre a oxi-, meta- e cianometa-HbGp, em diferentes valores de pH, e na presença de pequenas concentrações de SDS constituem um objeto interessante de pesquisa na área de interação HbGp-surfactante. Nesse contexto, na presente tese de doutorado são apresentados estudos de estabilidade térmica para HbGp, nas formas oxi-, meta- e cianometa-, em meio ácido, neutro e alcalino, na ausência e presença do surfactante aniônico SDS. Os estudos foram realizados usando as técnicas de absorção óptica, CD, DLS e SAXS. Esses estudos mostram que, em meio ácido, na presença e ausência de SDS, a HbGp desnatura em altas temperaturas, formando agregados grandes. No pH 7,0, a oxi-, meta- e cianometa-HbGp sofrem dissociação oligomérica, na presença de SDS, com o aumento da temperatura, antes do processo de desnaturação e agregação. Em meio alcalino, a HbGp dissocia completamente com o aumento de temperatura antes de desnaturar.

Capítulo 2

Objetivos

No presente capítulo são apresentados os objetivos geral e específico, almejado pelos estudos realizados com a hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) no presente trabalho.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo investigar a estabilidade térmica da oxi-HbGp na forma íntegra em relação aos processos de dissociação oligomérica, desnaturação e agregação, em diferentes condições de pH, e na ausência e presença de SDS, em diferentes valores de pH. Estes estudos permitirão avaliar os processos de dissociação, desnaturação e agregação, possibilitando a compreensão melhor desses fenômenos e a obtenção de valores de temperatura crítica (T_c) e variação de entalpia aparente (ΔH_{app}) e de parâmetros cinéticos.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Estudar o processo de desnaturação térmica da oxi- e cianometa-HbGp, na ausência de surfactante, em meio ácido e neutro, através das técnicas de absorção óptica e dicroísmo circular (CD). Além disso, obter os valores de temperatura crítica (T_c) e variação de entalpia aparente (ΔH_{app}) associadas ao processo de desnaturação induzido pela temperatura.
- 2) Estudar por SAXS os processos de dissociação oligomérica e desnaturação para a oxi-, meta- e cianometa-HbGp, em função do pH. Estimar com base nas curvas experimentais de SAXS e da função $p(r)$, a porcentagem das subunidades da HbGp dissociadas em solução, induzida pelo aumento da temperatura, em meio alcalino (pH 8,0 e 9,0).
- 3) Investigar o efeito da concentração de proteína na estabilidade térmica, em diferentes valores de pH, e na cinética de agregação da oxi-HbGp, pH 7,0, usando DLS.
- 4) Estudar a estabilidade térmica da oxi-HbGp, na presença de SDS, em pH 5,0 e 7,0 monitorando os processos de dissociação oligomérica, desnaturação e agregação, usando DLS e SAXS, no intervalo de temperatura de 25 a 70 °C.
- 5) Estudar a cinética de dissociação oligomérica da oxi-HbGp, em pH 7,0, na presença do SDS, em diferentes temperaturas e concentrações de proteína, usando DLS.

Capítulo 3

Materiais e métodos

Neste capítulo é apresentada uma breve descrição das técnicas de absorção óptica, dicroísmo circular (CD), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). Também são descritos os procedimentos de preparação das amostras, da realização das medidas, e de análise dos dados coletados.

3.0 Materiais e métodos

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

A HbGp é obtida pela extração da hemolínfa do anelídeo *Glossoscolex paulistus*, através de um corte no dorso do animal após o mesmo ser anestesiado em atmosfera de éter etílico (Fig. 5). Ao sangue coletado é adicionada solução anticoagulante de citrato de sódio e ácido cítrico 0,10 mol/L [3,13-15]. Após a coleta, o sangue extraído é centrifugado por 15 min a 2500 rpm para remoção de possíveis impurezas sólidas. Em seguida é ultracentrifugado por um período de 3 horas a 250.000 x g, a 4 °C. Após o processo de ultracentrifugação a proteína é obtida na forma de “pellet” (hemoglobina sedimentada no fundo do tubo). O “pellet” é re-suspendido em um volume mínimo de tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,0. Como processo final de purificação, a hemoglobina é filtrada em coluna de gel de Sephadex G-200, obtendo-se a proteína pura na forma oxi-HbGp. A concentração da oxi-HbGp foi determinada espectrofotometricamente utilizando o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{415\text{nm}} = 5,5 \pm 0,8 \text{ (mg / ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [13].

O anelídeo *Glossoscolex paulistus* é encontrado no interior do estado de São Paulo, mais especificamente nos municípios de Rio Claro e Piracicaba.

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

3.2 Preparação das formas oxidadas, meta- e cianometa-HbGp

Para preparar as formas oxidadas meta- e cianometa-HbGp, ferricianeto de potássio, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, na razão de cinco vezes a concentração de heme foi adicionado, a uma alíquota de oxi-HbGp (Figs. 6A e 6B). O excesso de ferricianeto de potássio é importante para assegurar que todos os átomos de ferro do grupo heme da oxi-HbGp (Fe^{+2}) sejam oxidados formando a meta-

HbGp (Fe^{+3}). Após 2 h da adição do $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a HbGp se encontra na forma meta-HbGp. Então, o excesso de ferricianeto é removido por diálise contra tampão tris-HCl, 100 mmol/L, pH 7,0 a 4 °C.

Para obtenção da cianometa-HbGp, cianeto de potássio (KCN) é adicionado a uma alíquota de meta-HbGp, na mesma razão estequiométrica do $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, e a solução é incubada por 2 h (Figs.6B e 6C). Em seguida, o excesso de KCN é removido através de diálise em tampão tris-HCl 100 mmol/L, em pH 7,0, a 4 °C. Assim, obtém-se a HbGp na forma cianometa-HbGp. As concentrações da meta- e cianometa-HbGp foram determinadas espectroscopicamente por absorção óptica usando $\epsilon_{405\text{nm}} = 4,1 \pm 0,8 \text{ (mg / ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{420\text{ nm}} = 4,8 \pm 0,8 \text{ (mg / ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente [13].

Figura 6: Representação esquemática dos passos para a obtenção das formas oxidadas meta- e cianometa-HbGp, partindo da forma oxi-HbGp. (A) oxi-, (B) meta- e (C) cianometa-HbGp.

3.3 Medidas de absorção óptica, dicroísmo circular (CD), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e espalhamento de raio X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de absorção óptica foram realizadas usando um espectrofotômetro UV-1601 da Shimadzu, equipado com controlador de temperatura com capacidade de operação na faixa de 10 a 70 °C, com precisão de 0,1 °C. As medidas foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 250 a 700 nm. A concentração de oxi- e cianometa-HbGp usada foi 0,2 mg/mL, em tampão misto de fosfato monobásico e dibásico de sódio 30 mmol/L, nos valores de pH 5,0, 6,0 e 7,0. O não uso

do tampão acetato de sódio (pH 5,0 e 6,0) nas medidas espectroscópicas deve-se ao fato do mesmo absorver na região do UV.

As medidas de CD foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC), do Laboratório Nacional de Luz Sincontron (LNS) e no Instituto de Física de São Carlos (IFSC), usando espectropolarímetros modelo J-815 da Jasco equipados com controlador de temperatura (Peltier) com capacidade de operação na faixa de temperatura de 10 a 90 °C. As medidas na região das ligações peptídicas foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 195-250 nm, e na região do grupo heme, de 250-500 nm. O tempo de resposta foi de 4 s, velocidade de varredura de 100 nm/min (região peptídica) e 200 nm/min (região do grupo heme), com intervalo de 0,5 nm por ponto.

As amostras da oxi- e cianometa-HbGp foram preparadas nos valores de pH 5,0, 6,0 e 7,0, no mesmo tampão e valores de pH usados nos experimentos de absorção óptica. A concentração de proteína foi 0,2 mg/L para as medidas na região das ligações peptídicas e 3,0 mg/mL para medidas na região do grupo heme. O intervalo de temperatura estudada foi de 20 a 80 °C, com um ponto a cada 2 °C e velocidade de aquecimento de 1 °C/min e 300 segundos de estabilização em cada temperatura.

As medidas de DLS foram realizadas usando um equipamento com ângulo de espalhamento fixo em 173°, da Malvern, Modelo Nano Zeta Size, que dispõe de um laser com comprimento de onda em 633 nm, com controlador de temperatura com precisão de 0,1 °C.

As amostras de oxi-, meta- e cianometa-HbGp foram preparadas no intervalo de pH de 5,0 a 8,0 em tampão fosfato-borato-acetato 30 mmol/L. O volume de amostra preparada para cada medida foi de 2 mL e a concentração de HbGp de 0,5, 1,0 e 3,0 mg/mL. As amostras foram filtradas com filtro de poro 0.45 µm (Millipore, Whatman, USA) diretamente na cubeta de vidro apropriada para as medidas de espalhamento de luz, para evitar a presença de contaminantes (“dust”), que podem levar a resultados de espalhamento de luz parciais e incorretos, afetando a determinação das dimensões das partículas espalhadoras na solução. Os estudos de cinética de agregação com a oxi-HbGp foram realizados com 0,5, 1,0 e 3,0 mg/mL, no pH 7,0, no intervalo de temperatura de 50 a 54 °C. Os estudos de “melting point” na presença de SDS, foram realizados na faixa de concentração de 0,0 a 0,6 mmol/L, no intervalo de temperatura de 20 a 70 °C. Todas as medidas de “melting” foram realizadas com razão de aquecimento 1 °C/min e 300 segundos de estabilização em cada temperatura. Os estudos de dissociação oligomérica da oxi-HbGp na presença de SDS, foram realizados na faixa de temperatura de 40 a 54 °C, para as concentrações de proteína 0,5 e 3,0 mg/mL, no pH 7,0.

As medidas de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), nas linhas de luz SAXS 1 e SAXS 2. As linhas de SAXS são equipadas com um detector bidimensional (MarCCD) e a distância amostra – detector utilizada foi de 1500 mm, possibilitando coletar as curvas de espalhamento no intervalo de q entre 0.01 a 0.25 $\text{\AA}^{-1}$.

As amostras de oxi-, meta- e cianometa-HbGp foram preparadas na concentração de 3,0 mg/mL, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmol/L na faixa de pH de 5,0 a 9,0, na ausência e presença de 0,2 e 0,4 mmol/L do surfactante SDS, no intervalo de temperatura de 20 a 60 °C. As curvas de espalhamento do tampão também foram coletadas e subtraídas das curvas de espalhamento da proteína, na presença e ausência de SDS. Estudos anteriores [19] mostraram que concentrações de SDS menores que 2 mmol/L produzem curvas de espalhamento idênticas as do tampão puro.

3.3.1 Análises dos dados de absorção óptica e dicroísmo circular (CD)

São descritos na literatura [27-30] vários modelos e equações que permitem obter parâmetros termodinâmicos do processo de desnaturação de proteínas. Esses modelos tem por base a condição de equilíbrio entre os estados nativo (proteína enovelada) e desnaturado (proteína desenovelada) e como ele é afetado por perturbações externas, tais como variações de pH, temperatura, adição de agentes caotrópicos ou surfactantes. No modelo de dois estados, as duas formas, nativa N e desnaturada D da proteína coexistem em equilíbrio no sistema, como mostra a equação abaixo [27-30].

A quantidade de proteína em cada estado pode ser definida pelas frações do estado nativo (F_N) e do estado desnaturado (F_D). A fração de proteína no estado nativo ou desnaturado pode ser expressa através de um parâmetro espectroscópico que está sendo usado para monitorar o processo de desenovelamento, como, por exemplo, o valor de elipticidade ou absorbância (equação 2, [28, 30]):

$$F_D = \left(\frac{\Delta\theta_N - \Delta\theta_X}{\Delta\theta_N - \Delta\theta_D} \right) \quad (2)$$

Onde F_D é a fração de proteína desenovelada (desnaturada), $\Delta\theta_N$ é a elipticidade ou a absorbância da proteína no estado nativo (N), $\Delta\theta_X$ é a elipticidade ou a absorbância em uma determinada temperatura T, e $\Delta\theta_D$ é a elipticidade ou a absorbância da proteína no estado desnaturado (D), assumindo como sendo correspondente a temperatura final (máxima), onde a proteína está 100 % desenovelada.

A energia livre envolvida (ΔG) no processo de desnaturação pode ser relacionada com a constante de equilíbrio K_{ND} com base na equações 3:

$$K_{ND} = \frac{[D]}{[N]} \rightarrow K_{ND} = \frac{F_D}{F_N} \quad (3)$$

e, como temos a condição que

$$F_D + F_N = 1 \quad (4)$$

logo, podemos escrever que:

$$K_{ND} = \frac{F_D}{F_N} = \frac{F_D}{1 - F_D} = \left(\frac{\Delta\theta_N - \Delta\theta_X}{\Delta\theta_X - \Delta\theta_D} \right) \quad (5)$$

A variação da energia livre de desnaturação, ΔG_{ND} , está relacionada com a variação de energia livre padrão de desnaturação, ΔG_{ND}^0 , e a constante de equilíbrio K_{ND} , de acordo com a equação 6 [29].

$$\Delta G_{ND} = \Delta G_{ND}^0 + RT \ln K_{ND} \quad (6)$$

onde R (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹ ou 1,9870 cal K⁻¹ mol⁻¹) é a constante universal dos gases, e T, a temperatura absoluta, é dada em Kelvin. Como no equilíbrio ΔG_{ND} é zero, a equação 6 pode ser re-escrita da seguinte forma:

$$\Delta G_{ND}^0 = -RT \ln K_{ND} \quad (7)$$

Da relação entre a energia livre de Gibbs e a entalpia e entropia, temos que:

$$\Delta G_{ND} = \Delta H_{ND} - T \Delta S_{ND} \quad (8)$$

Que nos leva à equação de van't Hoff (equação 9), que pode ser usada para determinação da variação de entalpia e de entropia a partir das constantes de equilíbrio de desnaturação da proteína desde que haja uma relação linear entre $\ln K_{ND}$ e o inverso da temperatura absoluta, o que presume que ΔH_{ND} não seja dependente da temperatura. Essa equação descreve o processo de desenovelamento térmico de uma dada proteína, que segue o modelo de dois estados, pode ser escrita como mostrado abaixo [27-30]:

$$\ln K_{ND} = - \left(\frac{\Delta H_{ND}}{R} \right) \cdot \left(\frac{1}{T} \right) + \left(\frac{\Delta S_{ND}}{R} \right) \quad (9)$$

Onde ΔH_{ND} e ΔS_{ND} são definidas nas equações 10 e 11, respectivamente:

$$\Delta H_{ND} = Cp_{ND} \Delta T \quad (10)$$

$$\Delta S_{ND} = Cp_{ND} \cdot \ln \left(\frac{T}{T_c} \right) \quad (11)$$

Dessa forma, baseado nas equações apresentadas acima, é deduzida a equação 12, levando em consideração o modelo de dois estados. Através dessa equação são obtidas as variações de entalpia (ΔH_{app}) e de capacidade calorífica (ΔCp_{app}) do processo de desnaturação térmica, assim como a temperatura crítica (T_c) de desnaturação da proteína. Nesse caso é assumido que a desnaturação da proteína segue um modelo de dois estados. Em sistemas que possuem processo de desnaturação irreversível ou parcialmente reversível, que é o caso da HbGp, a variação de entalpia e de capacidade calorífica são denominadas de aparentes (ΔH_{app} e ΔCp_{app}). A equação 12 é amplamente usada para ajustar dados de CD, absorção óptica e fluorescência, num dado comprimento de onda específico, para a obtenção de parâmetros termodinâmicos associados ao processo de desnaturação térmica [30]:

$$y = \left(\frac{(y_F + m_F \cdot T) + (y_U + m_U \cdot T) \cdot \exp\left(\frac{\Delta H_{app} \left(\frac{T}{T_c} - 1\right) + \Delta C p_{app} \left(T_c - T + T \cdot \ln \frac{T}{T_c}\right)}{R \cdot T}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{app} \left(\frac{T}{T_c} - 1\right) + \Delta C p_{app} \left(T_c - T + T \cdot \ln \frac{T}{T_c}\right)}{R \cdot T}\right)} \right) \quad (12)$$

Nessa equação o y representa o parâmetro espectroscópico monitorado, a elipticidade ou a absorbância em um dado comprimento de onda, como por exemplo, na banda de Soret em 415 nm, y_f e y_u são os interceptos da curva de elipticidade, m_f e m_u são as inclinações antes e depois da transição, respectivamente, T corresponde a uma dada temperatura, T_c é a temperatura crítica ou de transição, ΔH_{app} é a variação de entalpia aparente e $\Delta C p_{app}$ é a variação da capacidade calorífica aparente [30].

3.3.2 Análises dos dados de cinética de dissociação oligomérica da oxi-HbGp, no pH 7,0, na presença de SDS, em diferentes temperaturas, monitorada por DLS

As análises dos dados de cinética de dissociação da oxi-HbGp, na presença de SDS, monitorada por DLS, foram realizadas usando a equação 13, usando o programa *OriginPro8* da MicroCal (USA). Essa equação foi escrita com base no modelo de dissociação alcalina da HbGp, onde a dissociação completa da HbGp leva à formação de dodecâmero, que se dissocia em tetrâmero, que por sua vez dissocia formando trímero e monômero [14]. Essa equação cinética foi deduzida para ajustar as curvas de coeficiente de difusão médio (D_z), em função do tempo. Nos estudos de dissociação oligomérica da oxi-HbGp, na presença de SDS, em diferentes temperaturas é assumido que as espécies formadas são idênticas àsquelas produzidas pela dissociação alcalina.

$$D_z = \frac{(M_p^2 D_p - B D_\infty) e^{-kt} + B D_\infty}{(M_p^2 - B) e^{-kt} + B} \quad (13)$$

O modelo de dissociação oligomérica para a HbGp que originou a equação 13 é reportado na referência [14]. D_p corresponde ao coeficiente de difusão da HbGp íntegra no início $t=0$, M_p a massa molecular da proteína, k é a constante cinética de dissociação e t o tempo em segundos.

Nessa equação assume-se que a dissociação da HbGp leva a formação de 36 trímeros (*abc*), 36 monômeros (*d*) e 36 linkers (*L*) considerando que a estrutura íntegra da proteína possui estequiometria igual a $12(abcd)_3L_3$. Nessa equação, o parâmetro B é definido como: $B = 36(M_{abc}^2 + M_d^2 + M_L^2)$, e D_∞ é o valor para o coeficiente de difusão médio de todas as espécies dissociadas em solução no limite de tempo longo (infinito, [14]).

3.3.3 Análises dos dados de cinética de agregação da oxi-HbGp, pH 7,0, em diferentes temperaturas, monitorada por DLS

Através da técnica de DLS foram obtidas curvas do diâmetro hidrodinâmico da proteína observando-se o processo de agregação da oxi-HbGp em diferentes temperaturas. As análises foram realizadas com base na equação 14, sendo estimado o tempo necessário para o início da agregação. O modelo que originou a equação 14 foi proposto por Markossian, et. al. [31], e requer que no início do processo de agregação o sistema seja monodisperso, e com comportamento linear em função do tempo.

$$D_h = D_{h,0}^* \left(1 + \frac{(t - t_0)}{t_{2D}} \right) \quad (14)$$

Na equação acima o parâmetro $D_{h,0}^*$ corresponde ao diâmetro hidrodinâmico da proteína no início do processo de agregação, t_0 é o tempo requerido para que o processo de agregação seja iniciado ou “lag period”, e t_{2D} é o tempo necessário para que o valor de D_h seja duplicado [31]. As análises usando a equação 14 são permitidas apenas na faixa de tempo que o sistema permanece monodisperso durante o processo de agregação [31]. Os ajustes das curvas de cinética de agregação usando a equação 14 foram realizados usando o programa *Origin 8.0Pro* da Microcal (USA).

3.3.4 Análises dos dados de SAXS

As curvas de SAXS da HbGp na ausência e presença de SDS foram analisadas usando o programa GNOM desenvolvido por Svergun [32-35], para a obtenção dos parâmetros estruturais raio de giro (R_g), dimensão máxima (D_{max}) e $I(0)$ da proteína em solução.

Além disso, foi realizada uma estimativa da porcentagem das subunidades dissociadas em solução, para a oxi-, meta- e cianometa-HbGp, em pH alcalino (pH 8,0 e 9,0), em diferentes temperaturas, com base na função de distribuição $p(r)$, obtida das curvas experimentais de SAXS usando o programa GNOM. Essa análise quantitativa foi realizada usando uma combinação linear das curvas de distribuição $p(r)$ teóricas para a estrutura íntegra e das diferentes subunidades (fragmentos) da estrutura cristalográfica da hemoglobina ortóloga HbLt [33]. A estrutura cristalográfica da HbLt está disponível no PDB (Protein Data Bank) com código 2GTL [8]. Primeiramente, foram geradas as curvas de SAXS teóricas da estrutura íntegra e diferentes fragmentos cristalográficos da HbLt usando o programa CRY SOL [35]. Através do programa GNOM as funções de distribuição $p(r)$ foram obtidas das curvas de SAXS teóricas geradas pelo CRY SOL para a estrutura íntegra e dos fragmentos de HbLt (Fig. 15). As curvas de SAXS e as funções de distribuição $p(r)$ teóricas foram normalizadas pelo número de partículas espalhadoras considerando a estequiometria do oligômero HbLt igual a $12(abcd)_3L_3$. Essa normalização foi realizada para tornar mais adequada a estimativa da contribuição das diferentes subunidades em solução geradas pela dissociação da HbGp. Dessa forma, a combinação linear das funções de distribuição $p(r)$ teóricas foi realizada usando o programa *OriginPro* 8.0.

Também foi realizada uma estimativa de porcentagens das subunidades dissociadas em solução para a HbGp, em diferentes valores de pH e temperatura, usando o programa OLIGOMER [35]. Nas análises, as curvas de SAXS experimentais foram ajustadas usando o programa OLIGOMER, e as informações dos ajustes da $p(r)$ foram usadas como parâmetros de entrada. Para a análise no OLIGOMER é necessário fornecer as curvas de SAXS teóricas das possíveis partículas espalhadoras presentes na solução para que o programa realize o ajuste [26,36].

3.4- Técnicas de estudo

3.4.1 Absorção óptica no UV-VIS.

A técnica de absorção óptica consiste na comparação da intensidade do feixe de luz inicial feixe incidente (I_0), em relação ao feixe final ou a radiação transmitida pela amostra (I) após atravessar a amostra com extensão ℓ . A amostra deve ser diluída, uma vez que o processo de absorção de luz é governado pela lei de Beer-Lambert (equação 12, [36]). De acordo com ela a

fração de luz absorvida pela amostra pode ser expressa pela razão I_0/I que corresponde a transmitância (T) da radiação incidente na amostra [36]. Como geralmente os dados são expressos como valores de absorção, a relação entre transmitância (T) e absorção óptica (A) pode ser descrita pela equação abaixo.

$$T=I/I_0 \rightarrow A=\log (I_0/I) = \varepsilon.c.\ell \quad (15)$$

onde A corresponde à absorção óptica (absorbância), ε o coeficiente de absorção molar, c a concentração molar e ℓ o caminho óptico da cubeta usada nas medidas [36].

Absorção de luz por um cromóforo ocorre quando a frequência da radiação eletromagnética for maior ou igual à diferença de energia entre os dois níveis eletrônicos, o estado fundamental S_0 e o estado excitado S_1 da molécula absorvedora [36]. Nesse caso, fótons são absorvidos pelos elétrons do estado fundamental, sendo os mesmos promovidos para o estado excitado. A transição entre os dois estados, fundamental e excitado, ocorre em um tempo de aproximadamente 10^{-15} s [36]. Esse tempo é muito curto e não permite que as moléculas de solvente se orientem em torno do cromóforo, quando o mesmo absorve luz. Assim, a espectroscopia de absorção óptica se torna uma ferramenta importante para monitorar processos físico-químicos no sistema. A energia (E) absorvida na transição eletrônica está relacionada com a frequência da radiação (ν) pela lei de Plank (equação 16), onde h é a constante de Plank ($6,63 \times 10^{-34}$ J s, [36,37]).

$$E = h \nu \quad (16)$$

As vantagens que contribuem para o uso da espectroscopia de absorção óptica são: o fato de ser uma técnica quantitativa e os resultados, geralmente, serem de fácil interpretação [36]. Os parâmetros extraídos usando espectroscopia de absorção óptica são os comprimentos de onda máximos das bandas associadas aos diferentes cromóforos e a largura dessas bandas, que descreve o ambiente químico na vizinhança do cromóforo. As proteínas possuem cromóforos que absorvem em comprimentos de ondas específicos na região UV-VIS. Esses cromóforos são, basicamente, os aminoácidos aromáticos fenilalanina (260 nm), tirosina (275 nm) e triptofano (280 nm). No caso das hemoproteínas, o grupo heme apresenta três bandas características, uma entre 400-460 nm, banda de Soret, e outras duas entre 520-580 nm, que são as bandas-Q [23,36,37].

3.4.2 Dicroísmo circular (CD)

O dicroísmo circular (CD), do Inglês (Circular Dichroism), consiste em uma varredura com luz circularmente polarizada, a direita (R_r) e a esquerda (L_r), explorando o fato das moléculas biológicas, principalmente as proteínas possuírem centros assimétricos ou carbono quiral em sua estrutura [38,39]. As moléculas assimétricas interagem com a luz circularmente polarizada absorvendo parte da radiação eletromagnética (luz) quando o vetor elétrico da radiação polarizada se encontra paralelo ao seu momento de dipolo da ligação química [38,39]. Além disso, a interação da radiação polarizada com moléculas assimétricas leva a rotação da luz no plano. Assim, o sinal de CD é dado em termos da diferença ($\Theta = L_r - R_r$) em função do comprimento de onda, e $[\theta]$ elipticidade em unidades de $\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ que é o grau de rotação do campo elétrico da radiação no plano. A rotação da luz polarizada no plano reflete diretamente o grau de organização estrutural nas proteínas [38,39].

As proteínas apresentam basicamente três tipos de estruturas peptídicas: hélices α -, folhas- β e estruturas aleatórias, que não possuem uma organização definida [38,39]. O espectro de CD característico para uma proteína rica em α -hélices é caracterizado por ombros de mínimos com valores de elipticidades negativas em 222 (correspondente a transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$) e 208 nm (transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$). No caso de uma proteína rica em folhas- β é observado um ombro com elipticidade negativa em 215 nm e outro positivo em 198 nm, associado à contribuição das ligações peptídicas. Dessa forma, é possível identificar a predominância de um tipo de estrutura secundária de uma dada proteína, analisando visualmente o seu espectro de dicroísmo circular [38,39].

Dessa forma, a técnica de dicroísmo circular (CD) é amplamente utilizada para estimar a quantidade de estrutura secundária de proteína, e avaliar mudanças conformacionais ocasionadas por ligantes, agentes desnaturantes (acidez, ureia, cloridrato de guanidina, surfactantes, etc) e temperatura [38-40]. A avaliação da estabilidade de uma proteína induzido por um agente externo utilizando a técnica de CD pode fornecer informações sobre processos dinâmicos, bem como mudanças conformacionais e de estabilidade dos diferentes domínios presentes em uma proteína [38-40].

3.4.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Quando a luz (radiação) atravessa uma solução de macromoléculas, ela pode ser absorvida ou espalhada pelas partículas do meio. No caso do DLS, o instrumento registra a luz espalhada pelas moléculas em solução. O espalhamento de luz dinâmico (DLS do inglês Dynamic Light Scattering) ocorre devido a que o campo elétrico oscilante da radiação incidente num átomo ou molécula induz oscilações periódicas na nuvem eletrônica, levando a partícula a funcionar como uma fonte de radiação secundária [41,42].

As flutuações da intensidade de espalhamento de luz detectada no DLS estão relacionadas com o movimento aleatório ou Browniano das partículas em solução, devido às diferenças de densidade, decorrentes da aglomeração acidental de partículas e variação do número de moléculas no volume disperso. Dessa forma, o espalhamento de luz dinâmico mede a dependência da luz espalhada em um ângulo fixo em função do tempo. A medida de espalhamento de luz é útil na determinação das características das partículas em solução, envolvendo uma relação inversa entre o tamanho da partícula e o ângulo de espalhamento de luz. Com essas medidas o coeficiente de difusão pode ser obtido, com base na função de autocorrelação [41,42], que descreve o quanto rápido o sinal varia, e quanto tempo o mesmo leva para perder a memória do seu valor anterior, em decorrência do movimento Browniano das partículas. A função de autocorrelação é, em geral, uma função exponencial e está diretamente relacionada com o tamanho de partícula na solução [41,42].

Tendo em vista que partículas com diâmetro pequeno se movimentam rapidamente, a luz espalhada mostra flutuações rápidas. Por outro lado, partículas grandes se movimentam mais lentamente, de modo que a luz espalhada apresenta flutuações mais lentas. Portanto, a variação de intensidade da luz espalhada carrega informações úteis sobre o tamanho da partícula. Com o coeficiente de difusão e a viscosidade do solvente conhecidos, o raio hidrodinâmico pode ser calculado através da equação de Stokes-Einstein (equação 17):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (17)$$

onde k é a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do meio e R_h o raio hidrodinâmico das partículas espalhadoras, supondo que estas são esféricas [41,42].

Dessa forma, a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) permite monitorar o diâmetro hidrodinâmico de proteínas em função do tempo, da temperatura, do pH, e na presença de

agentes desnaturantes, tais como os surfactantes. Assim, é possível monitorar processos de dissociação, desnaturação e agregação de proteínas, em diferentes condições experimentais [41-43].

3.4.4 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

O espalhamento de raios X a baixo ângulo, (SAXS - do inglês - small angle X-ray scattering) é uma técnica muito utilizada para o estudo de partículas cujas dimensões variam de dezenas a centenas de angstroms, dependendo da configuração da óptica experimental [44-48]. O SAXS é utilizado para determinar características estruturais destas partículas ou de aglomerados de partículas dispersos em solução. A técnica de SAXS também permite monitorar mudanças de conformação molecular, a predição de estruturas quaternárias em oligômeros, a verificação de transições conformacionais que ocorrem devido à interação com ligantes ou perturbações externas [44-46].

Nos experimentos de SAXS, uma solução de macromoléculas diluída e homogênea é exposta a um feixe de raios X monocromático. Considerando que as moléculas em solução são esféricas, as ondas são espalhadas em um ângulo de 2θ , em relação ao plano do feixe incidente. Com o espalhamento de todos os elétrons que constituem a molécula, a superposição das ondas com todas as fases possíveis conduzirão a um espalhamento construtivo também na direção 2θ . Dessa forma, a intensidade de espalhamento (I) depende de alguns fatores como o número de partículas espalhadoras (n), a forma da partícula descrita pelo fator de forma $P(q)$, e as posições relativas entre as partículas descrita pelo fator de interferência $S(q)$, ou a função interferência, associado as interações entre as partículas espalhadoras no sistema [19,47]. A intensidade de radiação espalhada é dada pela equação 18:

$$I(q) = k n P(q) S(q) \quad (18)$$

Para sistemas de partículas espalhadoras homogêneas, que não interagem entre si, $S(q) \approx 1$ e a intensidade de espalhamento $I(q)$ é proporcional à função $P(q)$ e k é a constante de normalização que depende de densidade de partícula e de efeitos instrumentais. Informações relevantes sobre a estrutura das partículas espalhadoras podem ser obtidas através do parâmetro estrutural raio de giro (R_g). De acordo com a aproximação de Guinier, para valores de q pequenos, quando $q \rightarrow 0$, a curva de intensidade pode ser descrita por uma função exponencial (equação 19, [44-48]).

$$I(q) = I(0) \exp\left(-\frac{R_g^2 q^2}{3}\right) \quad (19)$$

onde o raio de giro R_g pode ser obtido da inclinação da curva de $\ln I(q)$ versus q^2 , obtida com um ajuste linear. Esta expressão de Guinier é válida na região de q , que satisfaz à condição $q.R_g \leq 1.0$ [47]. Essa análise baseada na aproximação de Guinier [47] fornece informação somente sobre o tamanho da partícula espalhadora através do valor de R_g , uma vez que, o ajuste é realizado com os valores de $I(q)$ do início da curva de espalhamento, nos valores de q baixos [47].

Outra forma de obter informações das partículas espalhadoras em solução através da curva de intensidade do espalhamento é através do cálculo da função de distribuição das distâncias, $p(r)$, que carrega a informação sobre a forma e a dimensão máxima ($D_{\max}$) da partícula espalhadora [47-49]. A função $p(r)$ descreve a probabilidade de serem encontrados dois centros espalhadores na partícula em estudo a uma distância r entre si, sendo descrita na equação abaixo. A análise nesse caso, para a obtenção da função de distribuição $p(r)$, é realizado na curva de espalhamento completa, permitindo que a forma da partícula espalhadora seja conhecida. Esse ajuste também permite a obtenção de parâmetros estruturais que caracterizam a partícula, tais como, o raio de giro (R_g) e a dimensão máxima da mesma. A função $p(r)$ está relacionada à intensidade de espalhamento $I(q)$ através da seguinte expressão:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q) \cdot qr \cdot \sin(qr) dq \quad (20)$$

Além disso, o valor de (R_g) também pode ser obtido através da função de distribuição $p(r)$ por meio da relação apresentada na equação 21:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{\max}} p(r) r^2 dr}{2 \int_0^{D_{\max}} p(r) dr} \quad (21)$$

Dessa forma, a função $p(r)$ é obtida através da transformada inversa de Fourier da curva de espalhamento $I(q)$ (equação 20), pela metodologia desenvolvida originalmente por Glatter [48]. O programa GNOM, desenvolvido por Svergun [34,35], permite obter essa transformação possibilitando de forma eficiente para uma dada curva de espalhamento de SAXS obter a curva da função $p(r)$ correspondente, bem como, os parâmetros estruturais mencionados acima.

Capítulo 4

Resultados e discussões

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados dos estudos de estabilidade térmica para a oxi-HbGp em pH ácido, neutro e alcalino, na ausência e presença do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS). Esses estudos foram realizados usando as técnicas de absorção óptica, dicroísmo circular (CD), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

Parte 1-Estabilidade térmica da oxi-, meta- e cianometa-HbGp, em meio ácido, neutro e alcalino.

4.0 Resultados e discussões

4.1 Estabilidade térmica da oxi- e cianometa-HbGp, em pH ácido e neutro, monitorada por absorção óptica.

Na Figura 7 são mostrados os espectros de absorção óptica para oxi- (Figs. 7A e 7B), e cianometa-HbGp (Figs. 7C e 7D), nos valores de pH 7,0 e 5,0, respectivamente, em diferentes temperaturas. Os espectros da oxi-HbGp, nos valores de pH 7,0 e 5,0, a 20 °C, são caracterizados por uma banda intensa centrada em 415 nm (banda de Soret) e por outras duas bandas menos intensas centradas em 540 e 575 nm (bandas-Q), enquanto que, a cianometa-HbGp tem a banda de Soret centrada em 420 nm, e diferentemente da forma oxi-, apenas uma banda-Q bem larga, com máximo em 540 nm, é observada nos mesmos valores de pH (Figs. 7C e 7D).

Figura 7: Espectros de absorção óptica para oxi- e cianometa-HbGp, 0,2 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L. Oxi-HbGp (A) pH 7,0 e (B) pH 5,0, cianometa-HbGp (C) pH 7,0 e (D) pH 5,0, nas temperaturas indicadas. Nos insertos a região das bandas-Q ampliada é mostrada.

Fonte: 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.

Com o aumento da temperatura, a oxi-HbGp, no pH 7,0, apresenta uma diminuição de intensidade na banda de Soret (Fig. 7A), e um deslocamento para o azul, de 415 para 405 nm, como mostrado na Fig. 8A. Comportamento similar é observado para as bandas-Q com o aumento da temperatura (inserto Fig. 7A). Esta perda de intensidade e deslocamento no máximo de absorção sugerem que a oxi-HbGp, no pH 7,0, começa a desnaturar acima de 50 °C. A cianometa-HbGp, no pH 7,0, apresenta comportamento espectral similar à forma oxi- com o aumento da temperatura, como pode ser observado nas Figuras 7C, 8C e 8D. Também são observadas mudanças expressivas nas bandas-Q para a oxi- e cianometa-HbGp para temperaturas acima de 54 °C (insertos das Figs. 7A e 7C). Essas mudanças são consistentes com a presença de uma mistura de espécies oxidadas em solução, provavelmente, oxi-HbGp, meta-HbGp e hemicromo, também caracterizado pelo ponto isosbético indicado pelas cetras dos insertos da Fig. 7. O ponto isosbético é observado em sistema onde existe um equilíbrio entre espécies [26,50-53]. Assim, a banda que surge em 630 nm (insertos das Figs. 7A e 7C) e o deslocamento do λ_{max} da banda de Soret (Figs. 8A e 8C), para oxi- e cianometa-HbGp, são característicos da mistura de espécies oxidadas de spin baixo e spin alto em solução [26,52,53].

Em pH 5,0 (Fig. 7B) a oxi-HbGp apresenta uma estabilidade térmica bem diferente quando comparada ao pH 7,0. O aumento de temperatura leva a uma pequena diminuição de intensidade na banda de Soret, acompanhada pelo deslocamento no λ_{max} (Fig. 8A). Esse deslocamento da banda de Soret é consistente com a oxidação do ferro do grupo heme induzida pela temperatura, e a formação de espécie oxidada, provavelmente uma mistura de aquo-meta-HbGp, devido ao surgimento da banda em 630 nm (inserto Fig. 7B, [26,50-53]). Além disso, temperaturas acima de 58 °C (pH 5,0) e 60 °C (pH 6,0, não mostrados) induzem uma forte agregação, caracterizada pelo intenso espalhamento de luz, como mostrado na Figura 8B. Por essa razão os espectros em temperaturas maiores que 58 °C foram omitidos (Fig. 8B). A cianometa-HbGp em pH 5,0, apresenta estabilidade térmica um pouco maior do que a forma oxi- (Fig. 7D). No entanto, o aumento de temperatura induz uma diminuição na intensidade da banda de Soret e ao surgimento de uma banda em 630 nm, sugerindo a formação de espécies de spin alto em solução, provavelmente, aquo-meta-HbGp [14,26,50-53]. A cianometa-HbGp também apresenta agregação em temperaturas maiores que 62 °C (Fig. 8D).

Na Figura 8E, são mostrados os valores de absorção em 415 e 420 nm e os respectivos ajustes usando o modelo de dois estados (equação 12), no pH 7,0, para oxi- e cianometa-HbGp, respectivamente. Esses gráficos de absorbância na banda de Soret, mostram uma pequena mudança, na faixa de temperatura de 20 a 52 °C, para as duas formas de HbGp. Essas mudanças graduais na absorção em 415-420 nm podem estar associadas à oxidação do ferro do grupo heme para a oxi-

HbGp, assim como, às mudanças conformacionais induzidas pela temperatura. Considerando que a HbGp possui uma estrutura oligomérica complexa, também é provável que ocorra a dissociação oligomérica parcial da proteína, seguida pela desnaturação em temperaturas maiores que 54 °C (Fig. 8E).

Figura 8: Valores do deslocamento $\lambda_{\max}$ e da absorbância para a oxi- e cianometa-HbGp 0,2 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L, em função da temperatura nos valores de pH indicados. (A) e (B) Oxi-HbGp, e (C) e (D) cianometa-HbGp. (E) Valores de absorbância para oxi- (415 nm) e cianometa-HbGp (420 nm), no pH 7,0, em função da temperatura, ajustada com base no modelo de dois estados, (equação 12). Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas cheias aos ajustes. ΔH_{app} é a variação de entalpia aparente e T_c a temperatura crítica de desnaturação, ambos obtidos dos ajustes mostrados.

Fonte: 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.

A partir dos ajustes com o modelo de dois estados foram obtidas as temperaturas críticas de desnaturação (T_c) sendo esses valores de 58 ± 2 e 59 ± 2 °C para oxi- e cianometa-HbGp, respectivamente (Fig. 8E). Esses valores de T_c similares para oxi- e cianometa-HbGp, podem estar associados à mudança da absorção em 420 nm mais acentuada entre 20 -52 °C, para a cianometa-HbGp comparada a forma oxi-HbGp (Fig. 8E). Estudos anteriores usando DLS mostram que, no pH 7,0, a cianometa-HbGp é substancialmente mais estável do que a forma oxi-, [13,14]. Nesses estudos não são observadas mudanças de diâmetro hidrodinâmico para a oxi- e cianometa-HbGp antes da temperatura crítica de desnaturação, como observado na absorção óptica [13,14,26]. Nesse caso, é importante observar que DLS monitora mudanças na estrutura global da proteína, enquanto que, a absorção óptica monitora mudanças do estado de oxidação do ferro e as mudanças de ambiente químico, na vizinhança do grupo heme. Dessa forma, a absorção óptica é muito sensível a pequenas mudanças no macrociclo do grupo heme. Embora, essas mudanças na absorbância em 415-420 nm antes da temperatura crítica não sejam desprezíveis, entretanto, não é possível ajustar essas curvas usando um modelo de três estados [30].

Os valores de variação de entalpia aparente (ΔH_{app}), obtidos com os ajustes usando o modelo de dois estados, foram de 660 ± 50 kJ/mol para a oxi- e 460 ± 40 kJ/mol para a cianometa-HbGp. Esses valores de ΔH_{app} não podem ser discutidos em maior profundidade, uma vez que, o processo de desnaturação térmica da HbGp, nas duas formas de oxidação, envolve o fenômeno de agregação como mostra a seção 4.3 abaixo [26,54]. Os valores de ΔH_{app} tem apenas um sentido qualitativo.

4.2 Estabilidade térmica da oxi- e cianometa-HbGp, em meio ácido e neutro, monitorada por dicroísmo circular (CD)

Os espectros de dicroísmo circular para a oxi-HbGp, na região das ligações peptídicas e do grupo heme, no pH 7,0, em diferentes temperaturas, são apresentados nas Figuras 9A e 9B. Na região das ligações peptídicas, a 20 °C, o espectro mostra uma região de mínimo (elipticidade negativa) em 222 nm, associado às estruturas secundárias em hélices- α , e uma banda com elipticidade positiva associada às ligações peptídicas em 195 nm (Fig. 9A). Na região do grupo heme, são observadas duas bandas com elipticidade positiva, a primeira em 415 nm (banda de Soret) é devida a assimetria induzida do grupo heme, e a segunda banda em 260 nm (Fig. 9B), está associada à contribuição dos aminoácidos aromáticos [39,40]. A cianometa-HbGp possui espectro

de CD na região das ligações peptídicas bem similar ao da forma oxi-(dados não mostrados). Na região do grupo heme a cianometa-HbGp possui banda de Soret centrada em 420 nm e a banda dos aminoácidos aromáticos em 262 nm (dados não mostrados).

Figura 9: Espectros de dicroísmo circular (CD) para oxi-HbGp, no pH 7,0, (A); na região das ligações peptídicas 0,2 mg/mL e (B) região do grupo heme 3,0 mg/mL. (C) Valores de elipticidade em 222 nm, para oxi-HbGp, em função da temperatura, nos valores de pH indicados, ajustada com um modelo de dois estados. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas cheias aos ajustes usando a equação 12.

Fonte: 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.

Com o aumento da temperatura a oxi-HbGp, mantém-se praticamente estável até 50 °C, na região das ligações peptídicas, e em temperaturas maiores ocorre a desnaturação da proteína, acompanhada pela perda acentuada de elipticidade (Fig. 9A). No meio ácido, o comportamento é similar ao pH 7,0 (Fig. 9C). O valor de elipticidade em 222 nm, para a oxi-HbGp, na forma desnaturada, a 80 °C, não é zero sugerindo que o processo de desnaturação não é completo (Figs.

9A e 9C). No meio ácido, os valores de elipticidade em 222 nm são ligeiramente maiores comparados ao pH 7,0, a 20°C, e resta bem menos sinal de elipticidade a 80 °C (Fig. 9C). Essa menor elipticidade no final do ciclo de aquecimento, observada no meio ácido (pH 5,0 e 6,0), provavelmente, deve-se a desnaturação da proteína com a formação de agregados e sedimentação parcial dos mesmos com o aumento da temperatura. Após o ciclo de aquecimento foi observado visualmente a presença de agregados de proteína sedimentados no fundo da cubeta. Por outro lado, no pH 7,0 não é observado agregado de proteína sedimentado após o ciclo de aquecimento, ou seja, os agregados formados permanecem em solução [26].

Na figura 7C são mostrados os valores de elipticidade em 222 nm, para a oxi-HbGp, no pH ácido e neutro, com os respectivos ajustes, baseados no modelo de dois estados, usando a equação 12. Também foram realizados ajustes similares para a cianometa-HbGp (dados não mostrados) e os parâmetros termodinâmicos obtidos são reunidos na Tabela 1. Oxi- e cianometa-HbGp, na região das ligações peptídicas e do grupo heme, apresentam um processo de desnaturação térmica de natureza irreversível, já que a recuperação do sinal de elipticidade, quando o sistema é resfriado a 20 °C, após ter sido aquecido a 80 °C, não foi observada. As curvas de elipticidade, em função da temperatura (Fig. 9C), mostram que a transição é mais rápida no meio ácido (pH 5,0 e 6,0), sugerindo que a agregação representa um passo importante no processo de desnaturação, para oxi- e cianometa-HbGp, sendo o fenômeno da agregação dependente do pH [26].

Figura 10: Valores de elipticidade para (A) oxi- (415 nm) e (B) cianometa-HbGp (420 nm), 3,0 mg/mL, em tampão fosfato 30mmol/L, em função da temperatura, nos valores de pH indicados.

Fonte: 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.

Na região do grupo heme o aumento da temperatura induz o surgimento de uma banda em 435 nm, em temperaturas maiores que 50 °C. Essa banda em 435 nm, permanece até 62 °C, e acima dessa temperatura, desaparece totalmente, assim como a banda de Soret, indicando que a oxi-HbGp desnatura completamente (Figs. 9B e 10A). O surgimento dessa banda em 435 nm está, provavelmente, associado com a formação de espécie oxidada como, por exemplo, o hemicromo, devido a oxidação do ferro do grupo heme com o aumento da temperatura, como mostram os dados de absorção óptica na seção 4.1. O processo de oxidação do ferro ocorre ao mesmo tempo em que a proteína começa a desnaturar, expondo o grupo heme ao solvente. Dessa forma, o acesso das moléculas de solvente à cavidade do grupo heme induz mudanças na coordenação do ferro e, provavelmente, na assimetria do heme, levando ao deslocamento espectral observado para a banda de Soret.

Os ajustes mostrados na Figura 9C permitiram a obtenção dos valores de temperatura crítica (T_c) e a variação de entalpia aparente (ΔH_{app}) do processo de desnaturação térmico, em pH ácido e neutro, para oxi- e cianometa-HbGp (Tabela 1). Para oxi-HbGp é observado que a temperatura crítica de desnaturação diminui com aumento de pH de 5,0 para 7,0, com valores de ΔH_{app} no intervalo de 670 ± 40 a 940 ± 50 kJ/mol, na região das ligações peptídicas (Tabela 1). Na região do grupo heme os valores de T_c são similares, comparados aos valores na região das ligações peptídicas. Por outro lado, os valores de ΔH_{app} da região do grupo heme são um pouco menores comparados aos valores obtidos na região das ligações peptídicas (Tabela 1). A cianometa-HbGp apresenta valores de T_c similares aos da forma oxi-, na faixa de pH de 5,0 a 7,0, entretanto os valores de ΔH_{app} são menores (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de temperatura crítica (T_c) e variação de entalpia aparente (ΔH_{app}), para a oxi- e cianometa-HbGp, obtidos usando dados de CD na região das ligações peptídicas (222 nm) e na região do grupo heme (415 e 420 nm), nos valores de pH indicados.

	pH	CD _{222 nm}	ΔH_{app} (kJ/mol)	CD _{415 nm}	ΔH_{app} (kJ/mol)
Oxi-HbGp	5,0	62 ± 2	660 ± 40	-	-
	6,0	63 ± 1	940 ± 50	65 ± 2	680 ± 60
	7,0	56 ± 2	670 ± 60	61 ± 3	500 ± 50
	pH	CD _{222 nm}		CD _{420 nm}	
Cianometa-HbGp	5,0	64 ± 1	590 ± 30	63 ± 3	585 ± 70
	6,0	66 ± 2	670 ± 40	68 ± 4	660 ± 90
	7,0	60 ± 2	390 ± 20	64 ± 3	310 ± 30

- Os valores de T_c e ΔH_{app} foram obtidos através dos ajustes mostrados na Fig. 7C [23,26].

Fonte: 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.

No pH 5,0, não foi possível ajustar a curva de elipticidade em 415 nm em função da temperatura, para oxi-HbGp, devido ao perfil da mesma ser diferente, comparado nos valores de pH 6,0 e 7,0 (Fig. 10A). Nesse caso, é observado um aumento de elipticidade na faixa de temperatura de 48 a 60 °C, provavelmente, associado à formação da espécie hemicromo, em decorrência da oxidação do ferro do grupo heme, durante o processo de desnaturação térmica (Fig. 10A). Além disso, é observado um pequeno deslocamento na banda de Soret para comprimento de onda maior, simultaneamente ao aumento de elipticidade nessa faixa de temperatura. Essas mudanças de elipticidade não são observadas na região dos aminoácidos aromáticos da oxi-HbGp e nem na banda de Soret da cianometa-HbGp (Figs.9C e 10B).

4.3 Estudos da cinética de agregação da oxi-HbGp em diferentes valores de temperatura e concentração de proteína, no pH 7,0, monitorando o diâmetro hidrodinâmico por DLS

Os estudos cinéticos de agregação da oxi-HbGp, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 3,0 mg/mL foram realizados no intervalo de temperatura de 50 a 54 °C, e as curvas de distribuição de tamanho baseados na intensidade de espalhamento são mostradas na Figura 11. Inicialmente (t=0,0 h) a oxi-HbGp 1,0 mg/mL, a 50 °C, encontra-se monodispersa com pico centrado em 27 nm, sendo

consistente com a proteína na forma íntegra (Fig. 11A). Após 3,8 h de incubação a 50 °C, surge um segundo pico, indicado pela seta na Figura 11A, na curva de distribuição, associado à formação do primeiro agregado. Esse pico do agregado se tornando mais pronunciado em 4,3 h, e apresenta uma contribuição igual ao pico da proteína íntegra depois de 4,9 h. Nos tempos maiores (9,15 h) o agregado se torna predominante, com 100 % de contribuição a partir de 10 h de incubação a 50 °C (Fig. 11A). Na temperatura de 54 °C (Fig. 11B), a oxi-HbGp também se encontra íntegra inicialmente, apresentando um único pico em 27 nm. Entretanto, o primeiro agregado surge com 1 h de incubação e se torna predominante no meio após 1,9 h, ou seja, em um tempo bem menor do que a 50 °C (Figs. 11A e 11B). O comportamento para a oxi-HbGp, nas concentrações de 0,5 e 3,0 mg/mL, é similar ao mostrado na Figura 11. Nesse caso, a concentração 0,5 mg/mL requer um tempo bem menor do que 1,0 mg/mL, enquanto que, o surgimento do primeiro agregado ocorre em tempos mais longos na concentração maior de 3,0 mg/mL (curvas de distribuição não mostradas).

Figura 11: Curvas de distribuição de tamanho baseados na intensidade de espalhamento (%) para oxi-HbGp 1,0 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L pH 7,0. (A) 50 °C e (B) 54 °C, em diferentes tempos de incubação.

Fonte: 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.

Na Figura 12 são mostradas as curvas de diâmetro hidrodinâmico e da intensidade de espalhamento em função do tempo, para a oxi-HbGp 1,0 mg/mL (Figs. 12A e 12B) e 3,0 mg/mL (Figs. 12C e 12D), em diferentes valores de temperatura. As curvas de D_h em função do tempo foram analisadas usando a equação 14 (Fig. 12E), que permitiu obter os parâmetros cinéticos, tais como, o período de dormência (o “lag period”) t_0 , a constante de agregação t_{2D} , e o diâmetro hidrodinâmico mínimo $D_{h,0}$, como mostrado na Tabela 2. Os valores de $D_{h,0}$ encontrados são

independentes da concentração de proteína e da temperatura, sendo de 27.3 nm, o que é consistente com o diâmetro da proteína íntegra [14,26]. Esse parâmetro indica que, diferentemente de algumas proteínas menores reportadas na literatura [30,55-57] o processo de agregação da oxi-HbGp não envolve nucleação para a formação de um agregado crítico. Estes ajustes mostram também que a oxi-HbG nas concentrações de 1,0 e 3,0 mg/mL a 50 °C, apresenta valores de t_0 iguais a 193 e 175 min, respectivamente. Outro parâmetro que caracteriza o processo de agregação é a constante t_{2D} , que aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de proteína a 50 °C, e diminui com o aumento da temperatura (Tabela 2). Isso significa que o processo de agregação se torna mais rápido com o aumento da concentração de proteína de 1,0 para 3,0mg/mL, e da temperatura. O valor de t_{2D} é bem maior para a oxi-HbGp 0,5 mg/mL a 54 °C, o que pode estar associado, nessa temperatura, à formação de espécies oxidadas, tais como a aquo-meta-HbGp e hemicromo, como mostram os dados de absorção óptica na seção 4.1.

Figura 12: Curvas de diâmetro hidrodinâmico e intensidade de espalhamento em função do tempo para a cinética de agregação térmica da oxi-HbGp, em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,0. Concentração de proteína (A), (B) e (E) de 1,0 mg/mL e (C) e (D) 3,0 mg/mL. (A) e (C) diâmetro hidrodinâmico, D_h nm, e (B) e (D) intensidade de espalhamento. (E) ajustes de D_h (nm) obtidos usando a equação 14, para obtenção dos parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 2.

Fonte: 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.

As diferenças nos valores de t_0 (min) reportados na Tabela 2, para 0,5 mg/mL de oxi-HbGp comparado com 1,0 e 3,0 mg/mL, podem ser justificadas pelas diferenças no grau de dissociação oligomérica parcial sofrido pela proteína antes de agregar. As curvas de intensidade de espalhamento para 1,0 e 3,0 mg/mL de proteína (Figs. 12B e 12D) mostram uma pequena diminuição de espalhamento em tempos mais curtos com o aumento da temperatura, associado à dissociação oligomérica parcial da oxi-HbGp antes de agregar. Para a concentração 0,5 mg/mL essa diminuição de espalhamento é ainda menor, ocorrendo a formação de agregados em um tempo menor (dados não mostrados).

Além disso, é observado que em tempos longos ocorre uma precipitação parcial dos agregados formados em solução, caracterizada por uma diminuição acentuada na intensidade de espalhamento nas curvas mostradas nas Figuras 12B (1,0 mg/mL) e 12D (3,0 mg/mL). Assim esses estudos de cinética mostram que a concentração de proteína é um fator importante no processo de agregação térmica da oxi-HbGp, em pH 7,0 [26].

Tabela 2: Parâmetros hidrodinâmicos e cinéticos para o processo de agregação para a oxi-HbGp, em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,0, em diferentes concentrações de proteína e temperaturas.

[oxi-HbGp], (mg/mL)	Temperatura (°C)	$D_{h,0}$, (nm)	t_0 , (min)	t_{2D} , (min)
0,5	50	$27,6 \pm 0,1$	112 ± 1	29 ± 1
	51	$27,4 \pm 0,2$	73 ± 1	22 ± 1
	52	$27,3 \pm 0,1$	30 ± 1	17 ± 1
	54	$27,4 \pm 0,2$	50 ± 1	197 ± 33
1,0	50	$27,7 \pm 0,1$	193 ± 1	611 ± 70
	51	$27,6 \pm 0,2$	148 ± 1	273 ± 15
	52	$27,5 \pm 0,1$	108 ± 1	149 ± 8
	54	$27,8 \pm 0,3$	56 ± 1	137 ± 9
3,0	50	$27,4 \pm 0,1$	175 ± 1	448 ± 20
	51	$27,4 \pm 0,1$	118 ± 1	300 ± 10
	52	$27,4 \pm 0,2$	82 ± 1	240 ± 2
	54	$27,2 \pm 0,3$	42 ± 1	198 ± 20

Os parâmetros $D_{h,0}$ (nm), t_0 (min), t_{2D} (min), foram obtidos através de ajustes como mostrado na Fig. 10E, usando a equação 14 [26,31].

Fonte: 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.

4.4 Efeito da concentração de proteína na estabilidade térmica da meta- e cianometa-HbGp, em função do pH

As curvas de “melting” para a meta-HbGp, na faixa de concentração de 0,5 a 3,0 mg/mL, em função do pH, são mostradas na Figura 13. Os parâmetros hidrodinâmicos e os valores de temperatura crítica do processo de desnaturação são apresentados na Tabela 3. No pH 5,0 (Fig. 13A) a meta-HbGp, a 0,5 mg/mL, é bastante estável, mantendo o diâmetro hidrodinâmico de 27 nm, até 60 °C. Acima dessa temperatura ocorre a desnaturação da proteína com a formação de agregados grandes, caracterizados por um aumento drástico no valor de D_h . Para a meta-HbGp, a 1,0 mg/mL, a temperatura crítica de desnaturação (T_{den}) se mantém em 60 ± 1 °C, enquanto que com 2,0 mg/mL de proteína, a desnaturação ocorre em temperatura menor, 57 ± 1 °C (Fig. 13A e Tabela 3). Além disso, o processo de desnaturação e formação de agregados, é seguido pela sedimentação parcial dos mesmos, resultando na oscilação do D_h acima de 60 °C (Fig. 13A).

Figura 13: Curvas de “melting” para meta-HbGp, na faixa de concentração 0,5 a 3,0 mg/mL, em acetato-fosfato-borato 30 mmol/L, na faixa de temperatura de 25 a 70 °C. (A) pH 5,0, (B) pH 7,0, (C) pH 7,5 e (D) pH 8,0.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, 2012.

No pH 7,0, a meta-HbGp, a 0,5 mg/mL, apresenta uma temperatura crítica um pouco menor do que no pH ácido, com o valor de T_{den} igual a 48 ± 1 °C, e o agregado formado a 70 °C também é menor (Fig. 13B e Tabela 3). Nesse pH, o aumento da concentração de proteína de 0,5 para 3,0 mg/mL não altera a temperatura de desnaturação, mas o tamanho do agregado em solução aumenta consideravelmente (Tabela 3). Comparando as curvas de “melting” da meta-HbGp, nos valores de pH 5,0 e 7,0, observa-se que, no meio ácido, ocorre uma pequena oscilação no diâmetro hidrodinâmico a partir de 40 °C, que é atribuída ao início da formação de agregados (insertos das Figs. 13A e 13B, [33]).

No pH 7,5 (Fig. 13C), a meta-HbGp, a 0,5 e 1,0 mg/mL apresenta uma ligeira diminuição no diâmetro hidrodinâmico com o aumento da temperatura, associada a dissociação oligomérica da proteína. Essa dissociação da proteína é seguida por um aumento gradual no D_h em temperaturas maiores que 44 °C, indicando a desnaturação da meta-HbGp (inserto Fig. 13C). No entanto, esse processo de dissociação oligomérica não é completo, uma vez que o diâmetro mínimo da meta-HbGp dissociada é consideravelmente maior do que o diâmetro hidrodinâmico de 10 nm correspondente a HbGp completamente dissociada [14]. Os processos de dissociação e desnaturação da meta-HbGp, a 0,5 e 1,0 mg/mL, se sobrepõem, com o aumento da temperatura. Para as concentrações 2,0 e 3,0 mg/mL de proteína, a dissociação oligomérica da proteína antes da desnaturação não é observada (inserto Fig. 13C). Também é importante mencionar que o aumento do valor de pH de 7,0 para 7,5 leva a uma diminuição da temperatura crítica de desnaturação de 48 °C para 44 °C (Tabela 3).

No pH 8,0, a estabilidade térmica da meta-HbGp é reduzida, comparada ao pH 7,0. Na faixa de concentração de 0,5 a 3,0 mg/mL, uma ligeira diminuição no D_h da meta-HbGp com o aumento da temperatura é observada (inserto e Fig.13D). Nesse caso, a dissociação oligomérica não é completa, tal como no pH 7,5, e os processos de dissociação e desnaturação também se sobrepõem, com o aumento da temperatura (inserto Fig. 13D). O menor valor de $\langle D_h \rangle_{min}$ obtido no pH 8,0 foi de 25 nm (Tabela 3), um valor que é bem maior do que o observado para a oxi-HbGp na forma dissociada em estudos anteriores [14,33].

Também foram realizados estudos de “melting” para a cianometa-HbGp, nos valores de pH 7,0 e 8,0, e os parâmetros hidrodinâmicos são apresentados na Tabela 3. As curvas de “melting” para a cianometa-HbGp são similares às da forma meta-HbGp, mostrados na Figura 13. No pH 7,0, o aumento da temperatura não induz a dissociação da cianometa-HbGp, a 0,5 mg/mL, e em temperaturas maiores que 56 ± 1 °C a proteína desnatura formando agregados grandes (Tabela 3). Diferentemente da oxi-HbGp [13,14], o aumento da concentração não induz mudanças de temperatura crítica de desnaturação na cianometa-HbGp, no pH 7,0 (Tabela 3). No pH 8,0, a

temperatura de dissociação oligomérica é deslocada para valores maiores com o aumento da concentração de proteína, sugerindo que a proteína se torna mais estável (Tabela 3). O aumento da concentração de proteína também leva a formação de agregados maiores como observado no pH 7,0 (Tabela 3).

Tabela 3: Valores de diâmetro hidrodinâmico e temperatura crítica, associados ao processo de desnaturação térmica da meta- e cianometa-HbGp, nas concentrações de proteína e valores de pH indicados. Esses parâmetros foram obtidos através das curvas de “melting” mostradas na Figura 13.

[HbGp] mg/ml	T _{diss} (°C)	<D _h > _{diss} (nm)	<D _h > _{min} (nm)	T _{den} (°C)	<D _h > _{den} (nm)
Meta-HbGp					
pH 5,0					
0,5	-	-	-	60± 1	2470 ±100
1,0	-	-	-	60± 1	400 ± 50
2,0	-	-	-	57± 1	12100 ± 250
pH 7,0					
0,5	-	-	-	48± 1	194± 7
1,0	-	-	-	47± 1	288± 10
2,0	-	-	-	48± 1	632± 15
3,0	-	-	-	48± 1	664± 20
pH 7,5					
0,5	40± 1	27± 1	19± 1	45± 1	52± 2
1,0	38± 1	27± 1	24± 1	44± 1	73± 3
2,0	-	-	-	44± 1	119± 5
3,0	-	-	-	44± 1	248± 8
pH 8,0					
0,5	25± 1	26± 1	20± 1	44± 1	35± 1
1,0	25± 1	27± 1	22± 1	45± 1	47± 2
3,0	34± 1	27± 1	25± 1	43± 1	153± 5
Cianometa-HbGp					
pH 7,0					
0,5	-	-	-	56 ± 1	100 ± 5
1,0	-	-	-	56 ± 1	123 ± 4
2,0	-	-	-	56 ± 1	138 ± 7
3,0	-	-	-	56 ± 1	690 ± 12
pH 8,0					
0,5	42 ± 1	27 ± 1	16 ± 1	51 ± 1	29 ± 2
1,0	43 ± 1	27 ± 1	17 ± 1	52 ± 1	36 ± 3
2,0	45 ± 1	27 ± 1	19 ± 1	52 ± 1	53 ± 4
3,0	49 ± 1	27 ± 1	23 ± 1	56 ± 1	70 ± 5

T_{diss} temperatura crítica de dissociação; T_{den} temperatura crítica de desnaturação; <D_h>_{diss} diâmetro hidrodinâmico da HbGp no início do processo de dissociação; <D_h>_{den} diâmetro hidrodinâmico na temperatura mais alta (70°C) , <D_h>_{min} diâmetro hidrodinâmico no valor mínimo de D_h na curva de “melting”.

Fonte-Carvalho, J.W.P., Santiago, P.S.; Batista, T.; Salmon, C.E.G.; Barbosa, L.R.S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, 2012.

Os valores de temperatura de desnaturação no pH 7,0, e de dissociação oligomérica no pH 8,0 são mostrados na Tabela 3, e indicam que a cianometa-HbGp é mais estável do que as formas oxi- [14,15] e meta-HbGp [33]. Além disso, esses estudos de “melting” com a meta- e cianometa-HbGp, em diferentes valores de pH e concentração de proteína, mostram que o efeito da concentração na estabilidade térmica dessas formas oxidadas de HbGp é similar ao reportado para a oxi-HbGp [14,15,33], mas não exatamente igual. A meta-HbGp parece ter maior tendência em agregar no pH 7,0, quando comparada com a oxi-HbGp [14,33], enquanto que, a cianometa-HbGp forma agregados um pouco maiores e mostra uma menor dependência da temperatura de desnaturação com o aumento de concentração. É importante ressaltar que a meta- e cianometa-HbGp nos diferentes valores de pH e concentração, apresentam um processo de desnaturação térmica de natureza irreversível, tendo em vista que, quando o sistema é resfriado a 25 °C, após o ciclo de aquecimento, o D_h permanece igual ao alcançado a 70 °C, o que é consistente com estudos anteriores [14,15].

4.5 Estabilidade térmica da oxi-, meta- e cianometa-HbGp, em pH ácido, neutro e alcalino monitorada por espalhamento de raio-x a baixo ângulo (SAXS)

4.5.1 oxi-HbGp

Na Figura 14 são mostradas as curvas experimentais de SAXS com os respectivos ajustes obtidos usando o programa GNOM, assim como, as curvas da função de distribuição de distâncias $p(r)$, para oxi-HbGp 3,0 mg/mL, em diferentes valores de pH e temperatura. Os parâmetros estruturais obtidos com os ajustes são mostrados na Tabela 4. Inicialmente, a 20 °C, a oxi-HbGp, no pH 7,0 (Fig. 14A), 5,0 (Fig. 14C) e 8,0 (Fig.14E), apresenta curvas de SAXS características da forma íntegra, com três ombros, sendo os dois primeiros bem intensos, em valor de q igual a 0,04 Å⁻¹ e 0,07 Å⁻¹, e o terceiro, menos intenso, em 0,12 Å⁻¹. Os valores observados de R_g e D_{mx} de 107 ± 1 Å e 300 ± 10 Å, respectivamente, são consistentes com a forma enovelada da proteína [19,33].

No pH 7,0 (Figs. 14A e 14B) a oxi-HbGp é estável até 40 °C, mantendo valores de raio de giro (R_g) e dimensão máxima (D_{max}) característicos da forma íntegra (Tabela 4). O aumento da temperatura de 40 °C para 50 °C, induz um decréscimo no valor de $I(0)$, mas o R_g e D_{max} permanecem constantes. No entanto, em temperaturas maiores os valores de R_g e D_{max} sofrem um

aumento significativo, alcançando $143 \pm 1 \text{ \AA}$ e $450 \pm 15 \text{ \AA}$, respectivamente (Tabela 4). Esse aumento no R_g e D_{max} é acompanhado pelo deslocamento para valores maiores de r do máximo da probabilidade de distancias da função de distribuição $p(r)$ (Fig. 14B). Esse aumento no R_g , D_{max} e o deslocamento da $p(r)$ para r maior são consistentes com a desnaturação da oxi-HbGp, e a formação de agregados em solução. Além disso, a diminuição do valor de $I(0)$ com o aumento da temperatura pode estar associada com uma precipitação parcial dos agregados formados em solução em alta temperatura (Tabela 4).

Figura 14: Curvas de SAXS para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL: (A) pH 7,0, (C), pH 5,0 e (E), pH 8,0. Os símbolos correspondem as curvas experimentais e as linhas aos ajustes usando o programa GNOM. Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$: (B) pH 7,0, (D) pH 5,0 e (F) pH 8,0, correspondentes aos ajustes mostrados em (A), (C) e (E), respectivamente.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44 – 55, 2012.

No pH 5,0, a oxi-HbGp é bem mais estável do que no pH 7,0, não ocorrendo mudanças significativas na intensidade das curvas de espalhamento e nos parâmetros estruturais, R_g e D_{max} , com o aumento de temperatura de 20 para 60 °C (Fig. 14C e Tabela 4). No entanto, são observadas pequenas mudanças de probabilidade de distância da função de distribuição $p(r)$ e nos valores de $I(0)$ com o aumento da temperatura. Essas mudanças podem ser atribuídas à sedimentação parcial de agregados de proteína formados em solução (Tabela 4), o que é consistente com os estudos por DLS (seção 4.4) e estudos reportados na literatura [33].

No pH 8,0 (Figs. 14C e 14D), a oxi-HbGp é menos estável, comparada ao pH 7,0. O aumento da temperatura de 20 para 50 °C, induz uma diminuição significativa nos valores de R_g e D_{max} , de $107 \pm 1 \text{ \AA}$ e $300 \pm 10 \text{ \AA}$ para $50 \pm 1 \text{ \AA}$ e $190 \pm 5 \text{ \AA}$, respectivamente. Essas mudanças nos valores de R_g e D_{max} estão associadas com a dissociação oligomérica da oxi-HbGp a partir de 55 °C (Tabela 4). O processo de dissociação oligomérica da oxi-HbGp leva à perda dos ombros característicos da forma íntegra e diminuição da intensidade da curva de espalhamento em q menor (Fig.14E). Essa redução de intensidade na curva de SAXS em q menor reflete diretamente no valor de $I(0)$, que nesse caso, apresenta uma diminuição de $0,10 \pm 0,01$ para $0,003 \pm 0,001$, no intervalo de temperatura de 20 a 60 °C, para a oxi-HbGp no pH 8,0 (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de R_g (Å), D_{max} (Å) e $I(0)$ (a.u.) para a oxi-HbGp, obtidos através do programa GNOM nos valores de pH indicados.

Temperatura (°C)	Oxi-HbGp	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
20	R_g	107 ± 1	106 ± 1	108 ± 1	107 ± 1
	D_{max}	300 ± 10	300 ± 10	300 ± 10	300 ± 10
	$I(0)$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
30	R_g	107 ± 1	107 ± 1	108 ± 1	106 ± 1
	D_{max}	300 ± 10	300 ± 10	300 ± 10	300 ± 10
	$I(0)$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
40	R_g	106 ± 1	106 ± 1	108 ± 1	105 ± 1
	D_{max}	300 ± 10	300 ± 10	300 ± 10	300 ± 10
	$I(0)$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$
50	R_g	108 ± 1	106 ± 1	108 ± 1	104 ± 1
	D_{max}	300 ± 10	300 ± 10	300 ± 10	280 ± 10
	$I(0)$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
55	R_g	107 ± 1	107 ± 1	137 ± 1	50 ± 1
	D_{max}	300 ± 10	300 ± 10	420 ± 10	190 ± 5
	$I(0)$	$0,08 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,003 \pm 0,001$
60	R_g	104 ± 1	105 ± 1	143 ± 1	50 ± 1
	D_{max}	300 ± 10	300 ± 10	450 ± 15	190 ± 5
	$I(0)$	$0,08 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,012 \pm 0,005$	$0,003 \pm 0,001$

Fonte- Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, 2012.

4.5.2 Cianometa-HbGp

As curvas experimentais de SAXS, com os respectivos ajustes através do GNOM, e as curvas da função de distribuição $p(r)$ para a cianometa-HbGp, a 3,0 mg/mL, em diferentes valores de pH e temperatura, são apresentadas na Figura 15. A cianometa-HbGp possui curvas de SAXS, a

20 °C, características da forma íntegra, nos valores de pH 7,0 e 5,0 (Figs. 15A e 15C), com ombros similares aos observados para a oxi-HbGp na seção 4.4.1. No pH 9,0 (Fig. 15E) os ombros associados ao estado nativo são bem menos intensos, comparados aos observados nos valores de pH 7,0 e 5,0. A intensidade da curva de espalhamento em q mínimo também é menor, sugerindo uma dissociação oligomérica parcial da proteína nessa condição (Fig.15E).

Figura 15: Curvas de SAXS para a cianometa-HbGp 3,0 mg/mL: (A) pH 5,0, (C), pH 7,0 e (E), pH 9,0. Os símbolos correspondem às curvas experimentais e as linhas aos ajustes obtidos usando o programa GNOM. Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$: (B) pH 5,0, (D) pH 7,0 e (F) pH 9,0, correspondentes aos ajustes mostrados em (A), (C) e (E), respectivamente.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, 2012.

Com o aumento da temperatura, a cianometa-HbGp se mantém praticamente estável, na faixa de temperatura de 20 a 60 °C, sendo, observadas mudanças nas curvas de SAXS (Fig. 15A). Os valores de R_g e D_{max} são mostrados na Tabela 5. As curvas de função de distribuição $p(r)$ apresentam uma pequena mudança de probabilidade (intensidade), que pode ser atribuída à precipitação parcial de agregados formados com o aumento da temperatura (Fig. 15B). Os valores de $I(0)$ também mudam muito pouco com o aumento da temperatura, o que confirma que a cianometa-HbGp é bem mais estável do que a forma oxi-, em pH 7,0. Além disso, no pH 5,0, a cianometa-HbGp (Figs. 15C e 15D) também se mantém estável, com valores de R_g e D_{max}

constantes durante o ciclo de aquecimento (Tabela 5). No pH 6,0, a estabilidade é similar ao pH 5,0 (Tabela 5).

No entanto, no pH 8,0, a cianometa-HbGp é um pouco menos estável do que no pH 7,0, em função do aumento de temperatura (Tabela 5). Os valores de R_g , D_{max} e $I(0)$ iguais a 93 ± 1 Å, 250 ± 5 Å e $0,02 \pm 0,01$ Å, respectivamente, indicam que a proteína encontra-se dissociada em 60 °C. No pH 9,0, o processo de dissociação oligomérica da cianometa-HbGp começa a 40 °C, com a perda de intensidade dos ombros característicos da forma íntegra, sendo que, eles desaparecem totalmente a 50 °C (Fig. 15E). Os valores de R_g e D_{max} diminuem para 75 ± 1 Å e 245 ± 5 Å, respectivamente, a 50 °C (Tabela 5). Com a dissociação oligomérica da cianometa-HbGp a probabilidade (intensidade) máxima da função de distribuição $p(r)$ é deslocada para valores de r menores (Fig.15F), e o perfil da curva é consistente com a presença de subunidades dissociada em solução [19,33,58,59].

Tabela 5: Valores de R_g (Å), D_{max} (Å) e $I(0)$ (a.u.) obtidos usando o programa GNOM para a cianometa-HbGp, nos valores de pH indicados.

Temperatura (°C)	Cianometa-HbGp	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0
20	R_g	107±1	107±1	107±1	108±1	107±1
	D_{max}	300±10	300±10	300±10	300±10	300±10
	$I(0)$	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,07±0,01
30	R_g	107±1	107±1	107±1	108±1	106±1
	D_{max}	300±10	300±10	300±10	300±10	300±10
	$I(0)$	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,07±0,01
40	R_g	107±1	107±1	108±1	108±1	106±1
	D_{max}	300±10	300±10	300±10	300±10	300±10
	$I(0)$	0,09±0,01	0,10±0,01	0,09±0,01	0,10±0,01	0,06±0,01
50	R_g	107±1	107±1	108±1	**	75±1
	D_{max}	300±10	300±10	300±10	**	245±5
	$I(0)$	0,09±0,01	0,09±0,01	0,09±0,01	**	0,012±0,001
60	R_g	107±1	106±1	108±1	93±1	**
	D_{max}	300±10	300±10	300±10	250±5	**
	$I(0)$	0,09±0,01	0,09±0,01	0,09±0,01	0,02±0,01	**

** Medidas não realizadas.

Fonte-Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, (2012).

4.5.3 Meta-HbGp

A meta-HbGp a 3,0 mg/mL, no pH 7,0 (Fig.16A), apresenta uma curva de SAXS similar às aquelas observadas para a oxi- e cianometa-HbGp, com os ombros característicos da forma íntegra, assim como valores de R_g , D_{max} e $I(0)$, a 20 °C, similares (Tabela 6). No pH 8,0, a 20 °C, as curvas de espalhamento são características da meta-HbGp totalmente dissociada, devido a inexistência dos ombros observados para a forma íntegra, no pH 7,0 (Fig.16C). Os valores de R_g e D_{max} de 92 ± 1 Å e 280 ± 5 Å, também são consistentes com a meta-HbGp dissociada em solução (Tabela 6). A dissociação da meta-HbGp também é caracterizada por uma função $p(r)$, que contém a contribuição de duas populações, consistente com a presença das diferentes subunidades dissociadas em solução (Fig.16D). Esses resultados a 20 °C, mostram que a meta-HbGp é consideravelmente menos estável em meio alcalino, tendo em vista que, a oxi- e cianometa-HbGp se mantêm na forma íntegra no pH 8,0, a 20 °C (seções 4.4.1 e 4.4.2).

Figura 16: Curvas de SAXS para a meta-HbGp 3,0 mg/mL: (A) pH 7,0 e (C), pH 8,0. Os símbolos correspondem às curvas de espalhamento experimental e as linhas aos ajustes usando o programa GNOM. Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$: (B) pH 7,0 e (D) pH 8,0, correspondentes aos ajustes mostrados em (A) e (C), respectivamente.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, 2012.

A meta-HbGp no pH 7,0, apresenta a curva de espalhamento com os ombros característicos da forma íntegra até 40 °C, com uma diminuição de intensidade significativa dos mesmos em temperatura maior que 50 °C (Fig.16A). Os valores de $I(0)$ também diminuem

consideravelmente de 0,10 para 0,04, na faixa de temperatura de 20 a 60 °C (Tabela 6). Além disso, R_g e D_{max} aumentam drasticamente a 60 °C, para 122 ± 1 Å e 400 ± 10 Å, respectivamente, indicando a desnaturação da proteína. O processo de desnaturação térmica da meta-HbGp é acompanhado pela diminuição de intensidade da (probabilidade) da função de distribuição $p(r)$, a partir de 40 °C. Além disso, a contribuição de agregados grandes na intensidade da função de distribuição $p(r)$ é visível a 60 °C (Fig. 16B).

Em meio ácido (valores de pH 5,0 e 6,0), a meta-HbGp apresenta curvas de espalhamento similares a oxi- e cianometa-HbGp (dados não mostrados). Essa forma oxidada da HbGp também é praticamente estável entre 20 e 60 °C, uma vez que não ocorrem mudanças nos parâmetros R_g e D_{max} (Tabela 6).

Tabela 6: Valores de R_g (Å), D_{max} (Å) e $I(0)$ (a.u.), para meta-HbGp obtidos usando o programa GNOM, nos valores de pH indicados.

Temperatura(°C)	Met-HbGp	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
20	R_g	107±1	107±1	107±1	92±1
	D_{max}	300±10	300±10	300±10	280±5
	$I(0)$	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,010±0,005
30	R_g	107±1	107±1	107±1	90±1
	D_{max}	300±10	300±10	300±10	295±5
	$I(0)$	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,010±0,005
40	R_g	106±1	107±1	107±1	**
	D_{max}	300±10	300±10	300±10	**
	$I(0)$	0,10±0,01	0,09±0,01	0,09±0,01	**
50	R_g	107±1	107±1	105±1	**
	D_{max}	300±10	300±10	300±10	**
	$I(0)$	0,09±0,01	0,09±0,01	0,07±0,01	**
60	R_g	106±1	106±1	122±1	**
	D_{max}	300±10	300±10	400±10	**
	$I(0)$	0,09±0,01	0,09±0,01	0,04±0,01	**

** Medidas não realizadas.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, 2012.

4.6 Análises da dissociação oligomérica da oxi-, meta- e cianometa-HbGp, em diferentes valores de pH e temperatura

Como descrito anteriormente na seção 3.3.4 na descrição de materiais e métodos, o programa GNOM foi usado para a obtenção da função de distribuição de distâncias $p(r)$, a partir das curvas experimentais de SAXS da HbGp, assim como dos diferentes fragmentos (subunidades) da

estrutura cristalográfica da HbLt, usando as curvas teóricas correspondentes geradas pelo programa CRY SOL [33,34,35]. As curvas de função de distribuição $p(r)$ obtidas dos dados experimentais foram ajustadas usando uma combinação linear das funções $p(r)$ teóricas correspondentes à HbLt íntegra e aos seus diferentes fragmentos obtidos da estrutura cristalográfica. Através desses ajustes e assumindo que a estrutura de HbLt é totalmente similar a de HbGp sua ortóloga, obteve-se as porcentagens de contribuição das diferentes subunidades da HbGp em solução. Convém mencionar que essas porcentagens são aproximadas, tendo em vista que, as curvas teóricas foram obtidas usando a aproximação de corpo rígido, ou seja, os fragmentos da estrutura cristalográfica da HbLt, que podem não ser exatamente iguais à proteína em solução. Nessa quantificação das subunidades da HbGp, dissociadas em solução foi usado também o programa OLIGOMER para ajustar as curvas de SAXS experimentais. Esse programa usa curvas de espalhamento teóricas de diferentes fragmentos cristalográficos para ajustar a curva experimental [33], que descreve, por exemplo, um equilíbrio do tipo monômero $\rightleftharpoons$ dímero.

Os ajustes da $p(r)$ e da curva de espalhamento experimental da HbGp foram realizados usando a $p(r)$ e a curva de espalhamento teórica dos diferentes fragmentos da HbLt, como por exemplo: o dodecâmero $(abcd)_3$, o tetrâmero $(abcd)$ e o trímero (abc) , e algumas combinações usando o linker e o monômero (d) , do tipo $abc+L$ e $abc+d$ (Fig. 17, [33]). A contribuição do monômero e do linker isolados em solução não foi considerada nos ajustes, devido a sua baixa influência na intensidade da curva de espalhamento, comparada com as subunidades de pesos moleculares maiores (Fig. 17). As análises iniciais, usando o OLIGOMER, mostraram que a inclusão da contribuição dessas subunidades de baixo peso molecular, eleva consideravelmente o valor do erro dos ajustes comparado àqueles onde essas subunidades menores não são consideradas na forma isolada (pura). Da mesma forma, para os ajustes da combinação linear da função de distribuição $p(r)$ usando o *OriginPro 8.0*, obtêm-se resultados melhores quando a contribuição das subunidades menores é desconsiderada. Os resultados obtidos pela combinação linear da $p(r)$ foram usados como parâmetro de entrada nos ajustes com o programa OLIGOMER [32].

As curvas de SAXS teóricas para a HbLt e seus fragmentos, com as correspondentes curvas de distribuição $p(r)$ são mostradas nos insertos das Figuras 17A e 17B. Essa figura foi dividida em duas partes para destacar a contribuição dos fragmentos de maior (Fig.15A) e menor (Fig. 17B) peso molecular. A intensidade das curvas de espalhamento e das funções de distribuição $p(r)$ foi normalizada pelo peso molecular do fragmento correspondente (Figs. 17 A e 17B). Nessa normalização da $p(r)$ pela massa molecular das subunidades foi assumida a estequiometria de $12(abcd)_3L_3$ para a estrutura íntegra da HbLt e HbGp [3,33].

Figura 17: Curvas teóricas de SAXS, obtidas usando o programa CRY SOL [32,35], e baseados na estrutura cristalográfica da HbLt, depositada no PDB código 2GTL[8]. (A) Curvas de SAXS para a proteína íntegra e fragmentos com maior peso molecular e (B) para os fragmentos com menor peso molecular. Os insertos em (A) e (B) correspondem às funções de distribuição de distâncias $p(r)$ correspondentes, obtidas usando o programa GNOM, das respectivas curvas de SAXS em (A) e (B).

Fonte- Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, 2012.

A Figura 18 mostra as funções de distribuição $p(r)$ e as curvas de espalhamento (insertos da Fig.18) experimentais geradas pelo GNOM para a oxi-, meta- e cianometa-HbGp, em diferentes valores de pH e temperatura, com os respectivos ajustes usando uma combinação linear das $p(r)$ e das curvas de espalhamento teóricas da HbLt íntegra e seus fragmentos (Fig.18). A função de distribuição $p(r)$ da oxi-HbGp, pH 7,0, a 20 °C (Fig. 18A) foi ajustada com 100 % de proteína íntegra, sendo que um ajuste similar da curva de espalhamento foi obtido através do OLIGOMER (inserto Fig. 18A e Tabela 7). Esses ajustes, confirmam que em pH 7,0 a 20 °C, a HbGp, encontra-se totalmente na forma íntegra. Esses ajustes descrevem bem a proteína nessas condições experimentais.

Figura 18: Curvas da função de distribuição $p(r)$ e de intensidade $I(q)$ (curvas de SAXS) experimentais para a HbGp, em diferentes estados de oxidação, pH e temperatura. As curvas $p(r)$ experimentais foram obtidas usando o programa GNOM. Os ajustes mostrados junto com a $p(r)$ experimental foram realizados com a combinação linear das curvas de $p(r)$ teóricas obtidas para a estrutura cristalográfica da HbLt, mostradas na Figura 15. (A) oxi- HbGp pH 7,0 a 20°C, (B) pH 8,0 a 60°C, (C) Cianometa-HbGp pH8,0 a 60°C e (D) pH 9,0 a 50 °C, (E) meta-pH 8,0 a 30 °C. Nos insertos são mostradas as curvas experimentais de SAXS para HbGp (símbolos) e o ajuste usando o programa OLIGOMER (linha contínua).

Fonte- Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, 2012.

Na Figura 18B a $p(r)$ da oxi-HbGp, pH 8,0 a 60 °C, é mostrada com o respectivo ajuste, usando a combinação linear dos fragmentos de HbLt, sendo obtidas as seguintes porcentagens de contribuição: $2 \pm 1\%$ de uma metade da proteína íntegra, que corresponde a $6x(abcd)_3L_3$ $48 \pm 13\%$ de dodecâmero, e $50 \pm 43\%$ de tetrâmero (Tabela 7). Esses resultados são consistentes com o fato da $p(r)$ experimental se estender somente até 200 Å. Embora exista a contribuição de partículas maiores que 100 Å em menor intensidade, provavelmente, são agregados de proteína desnaturada. Por essa razão o ajuste da Figura 18B foi limitado a 150 Å, tendo em vista que o ajuste realizado na $p(r)$ completa apresenta uma distorção na curva de ajuste, mas as três espécies são mantidas com

percentagem diferente dos valores da Tabela 7. O fato de haver a contribuição de partículas maiores de 150 Å, associada à proteína desnaturada, impede que a curva $p(r)$ completa seja ajustada corretamente. Isto se deve a que, o nosso modelo de ajuste não contém um termo que descreva a contribuição do agregado. O melhor ajuste da curva de SAXS experimental da oxi-HbGp, no pH 8,0, e a 60 °C, usando o OLIGOMER, foi obtido pela combinação dos fragmentos $6x(abcd)_3L_3$, que corresponde a uma metade da proteína íntegra, dodecâmero e tetrâmero (inserto Fig. 18B). Esse ajuste com o OLIGOMER mostra uma contribuição de $5,3 \pm 0,2\%$ do fragmento $6x(abcd)_3L_3$, $23 \pm 1\%$ de dodecâmero e $72 \pm 1\%$ de tetrâmero, respectivamente, corroborando com a existência de maior quantidade de dodecâmero e tetrâmero e a presença de uma pequena fração de $6x(abcd)_3L_3$ em solução, nessa condição (Tabela 7).

Na Figura 18C são mostrados os ajustes da $p(r)$ e da curva de SAXS experimental para a cianometa-HbGp, no pH 8,0, e a 60 °C. O ajuste da $p(r)$ mostra a contribuição de $11 \pm 1\%$ de proteína íntegra, $6 \pm 3\%$ do fragmento $6(abcd)_3L_3$, $61 \pm 5\%$ de dodecâmero e $22 \pm 2\%$ de tetrâmero, respectivamente (Tabela 7). Esses resultados são consistentes com a existência de oscilações na curva de SAXS mostrada no inserto da Figura 18C e com os dois ombros intensos na $p(r)$ na Figura 16C. O ajuste com o OLIGOMER da curva de SAXS (inserto Fig. 18C) mostra a contribuição de $13 \pm 1\%$ de proteína íntegra, $12 \pm 1\%$ de $(abcd)_3L_3$, $49 \pm 1\%$ de dodecâmero, e $26 \pm 1\%$ de tetrâmero, confirmando que a cianometa-HbGp dissocia menos que a oxi-HbGp (Fig.18B e Tabela 7). No pH 9,0, a 50 °C, a cianometa-HbGp apresenta um ajuste da $p(r)$ com uma contribuição de $7 \pm 1\%$ de proteína íntegra, $47 \pm 4\%$ de dodecâmero e $46 \pm 1\%$ de tetrâmero. O ajuste com o OLIGOMER fornece $7,8 \pm 0,2\%$ de $6(abcd)_3L_3$, metade da proteína íntegra, $38 \pm 1\%$ de dodecâmero e $54 \pm 1\%$ de tetrâmero. Esses resultados mostram que o aumento do pH de 8,0 para 9,0 leva a uma diminuição da contribuição de espécies de peso molecular maior, e um aumento significativo de cerca de duas vezes na contribuição do tetrâmero quando comparado ao pH 8,0 (Tabela 7), sendo consistente com o maior grau de dissociação oligomérica da cianometa-HbGp em pH mais alcalino e com os resultados de DLS reportados na seção 4.4 [33].

O ajuste da $p(r)$ da meta-HbGp, pH 8,0 a 30 °C, apresentado na Figura 18E, mostra a contribuição de $2,0 \pm 0,3\%$ de proteína íntegra, $12 \pm 1\%$ da subunidade $6(abcd)_3L_3$, $16 \pm 8\%$ de dodecâmero e $70 \pm 26\%$ de **abc+d**, ou seja, a soma do trímero (**abc**) com monômero **d**. O ajuste do OLIGOMER indica uma porcentagem similar ao da $p(r)$, como mostrado na Tabela 7. Esses resultados são consistentes, pois a meta-HbGp é muito instável a 20 °C, onde as análises por GNOM sugerem que a proteína se encontra dissociada, como reportado na seção 4.5.

Portanto, os estudos de estabilidade térmica da HbGp em pH alcalino por SAXS, mostram claramente a seguinte ordem de estabilidade: cianometa->oxi->meta-HbGp. Essa ordem de

estabilidade reflete diretamente o estado de oxidação do ferro do grupo heme e a força do ligante presente na sexta coordenação do metal. Na cianometa-HbGp o ferro do grupo heme se encontra no estado oxidado Fe^{+3} , e o CN^- , que ocupa a sexta coordenação do metal, é um ligante forte. Estudos apontam que o fato do cianeto ser um ligante forte induz mudanças estruturais na proteína que a torna mais estável [60]. Embora, o ferro do heme se encontre no estado reduzido (Fe^{+2}) na forma oxi-HbGp, o O_2 que ocupa a sexta coordenação do metal é um ligante mais fraco do que o cianeto, tornando essa forma menos estável que a cianometa-HbGp. Para a meta-HbGp a molécula de água que ocupa a sexta coordenação do ferro oxidado (Fe^{+3}) do grupo heme, é um ligante bem mais fraco comparado ao O_2 e cianeto, e consequentemente essa forma de HbGp é a menos estável das três [40,60].

Tabela 7: Porcentagem de contribuição dos fragmentos (subunidades) obtidos pelo ajuste da $p(r)$ experimental da HbGp, pela combinação linear das curvas $p(r)$ teóricas e usando o programa OLIGOMER, para a oxi-, cianometa- e meta-HbGp nas temperaturas indicadas. Os ajustes são mostrados na Figura 18.

	Oxi-HbGp				Cianometa-HbGp				Meta-HbGp	
	pH 7,0 20 °C		pH 8,0 60 °C		pH 8,0 60 °C		pH 9,0 50 °C		pH 8,0 30 °C	
Fragmentos	% $p(r)$	%OLIG.	% $p(r)$	%OLIG.	% $p(r)$	%OLIG.	% $p(r)$	%OLIG.	% $p(r)$	%OLIG.
Íntegra	100%	100%	-	-	11±1	13±1	-	-	2,0±0,3	1±1
$6 \times (abcd)_3 L_3$	-	-	2±1	5,3±0,2	-	-	7±1	7,8 ±0,2	12±1	11±1
$1/12(abcd)_3 L$	-	-	-	-	6±3	12±1	-	-	-	-
$(abcd)_3$	-	-	48±13	23±1	61±5	49±1	47± 4	38±1	16±8	16±1
$(abcd)$	-	-	50±43	72±1	22±2	26±1	46 ±1	54±1	-	-
$abc+d$	-	-	-	-	-	-	-	-	70±26	72±1

% $p(r)$ - Porcentagem das diferentes subunidades obtidas através de ajustes da $p(r)$ experimental da HbGp pela combinação linear da $p(r)$ teórica dos diferentes fragmentos (subunidades) da HbLt, como mostrado na Figura18.

%OLIG- Porcentagem das diferentes subunidades com ajustes usando o programa OLIGOMER.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S.; Batista, T.; Salmon, C. E. G.; Barbosa, L. R. S.; Itri, R.; Tabak, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies, **Biophysical Chemistry**, v. 163–164, p. 44–55, 2012.

Vários estudos, baseados na técnica de SAXS, são reportados na literatura para os processos de dissociação, desnaturação e agregação para diferentes proteínas, induzidos por variação de pH, altas concentrações de sal e presença de cloreto de guanidina [44,45,49,61-66]. Nesses estudos a caracterização de espécies dissociadas em solução também é descrita, principalmente para sistemas envolvendo o equilíbrio de homo-dímeros com os monômeros correspondentes [62,64]. Além disso, existem também estudos para proteínas oligoméricas, tais como, homo-tetrâmero e homo-hexâmero [58,66]. O fato dessas proteínas possuírem estruturas

compostas por subunidades com massa molecular idêntica, torna as análises relativamente mais fácil, bem como, a escolha de um modelo de análise adequado. Entretanto, a HbGp é uma proteína oligomérica complexa, formada por sete cadeias, 4 globinas e 3 linkers, com massas moleculares diferentes, na faixa de 16 a 52 kDa, sendo que 3 globinas formam um hetero-trímero associado por pontes dissulfeto, podendo as mesmas se arranjar de diferentes formas. Dessa forma, é muito mais difícil deduzir um modelo de análise, assim como, ajustar a curva de espalhamento experimental. Além disso, estudos por ultracentrifugação analítica [20], e cromatografia de exclusão por tamanho [3,6], mostram que na dissociação alcalina da HbGp as cadeias linkers (*L*) preferem se ligar a subunidade trímero (*abc*), enquanto que, o monômero *d* permanece isolado, em solução. Considerando essas dificuldades pela complexidade da estrutura oligomérica da HbGp, algumas simplificações na dedução do modelo usado nas análises dos dados de SAXS para o processo de dissociação oligomérica, apresentado e discutido acima, foram necessárias. Nesse modelo foi desconsiderada a contribuição dos linkers isolados, e também do monômero *d*. A contribuição do monômero *d* isolado é muito baixa na curva de espalhamento, comparada a outras subunidades como, por exemplo, o tetrâmero (*abcd*) e o dodecâmero (*abcd*)₃. Essas simplificações foram essenciais para que as curvas de espalhamento experimentais fossem ajustadas com sucesso. Apesar das dificuldades citadas acima, acreditamos que nossos resultados representam um avanço importante no entendimento da estabilidade térmica da HbGp, em diferentes valores de pH. Eles representam também um avanço no entendimento do processo de dissociação oligomérica induzido pela temperatura e na caracterização das espécies dissociadas em solução [33].

***Parte 2- Estabilidade térmica da oxi-HbGp na presença
do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS)***

4.7 Estabilidade térmica da oxi-HbGp, na presença de SDS, em pH ácido e neutro, monitorada por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

4.7.1 pH 7,0

Na Figura 19A são apresentadas as curvas de “melting” para a oxi-HbGp 0,5 mg/mL, pH 7,0, em diferentes concentrações de SDS. Os parâmetros hidrodinâmicos e térmicos obtidos através dessas curvas (Fig.19) encontram-se reunidos na Tabela 8. Pode-se observar que a oxi-HbGp, no pH 7,0, possui um valor de D_h de 27 ± 1 nm, a 25°C , em toda a faixa de concentração de SDS estudada (0-0,6 mmol/L), sugerindo que a proteína mantém-se na forma íntegra [13-15, 67] nessa temperatura [67].

Figura 19: Curvas de “melting” para a oxi-HbGp, na concentração de 0,5 mg/mL, em fosfato-acetato 30 mmol/L, na presença de SDS, na faixa de temperatura de 20 a 70°C . (A) pH 7,0 e (B) pH 5,0.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

Na ausência de SDS, a oxi-HbGp no pH 7,0 mantém o diâmetro hidrodinâmico de 27 ± 1 nm até a temperatura de $52 \pm 1^\circ\text{C}$, sofrendo desnaturação acima dessa temperatura, caracterizada pelo aumento do D_h com formação de agregados, com diâmetro hidrodinâmico de 247 ± 2 nm, a 70°C (Fig. 19A e Tabela 8). Na presença de 0,2 mmol/L de surfactante, a temperatura de desnaturação mantém-se em 52°C (Tabela 8). No entanto, na curva de “melting”, é observado que entre 48 e 50°C , a oxi-HbGp começa a sofrer dissociação oligomérica, seguido da desnaturação antes que a

dissociação se torne mais extensa (inserto da Fig. 19A). Esse início de dissociação oligomérica reflete no tamanho dos agregados a 70 °C formado pela proteína desnaturada, que são um pouco menor que o observado na ausência de surfactante (Tabela 8). A partir da concentração de 0,4 mmol/L de SDS, uma extensa dissociação oligomérica é observada, seguida pela desnaturação das subunidades (Fig. 19A). Além disso, com o aumento da concentração de surfactante a temperatura de dissociação (T_{diss}) é deslocada para valores menores (Tabela 8). Como consequência do aumento do grau de dissociação oligomérica da oxi-HbGp, o diâmetro mínimo $\langle D_h \rangle_{\text{min}}$ das subunidades dissociadas se torna menor, alcançando um valor mínimo de 12 ± 1 nm, na concentração 0,6 mmol/L de SDS (Fig. 19A e Tabela 8). Essa dissociação oligomérica mais intensa torna o agregado da proteína desnaturada bem menor, com diâmetro hidrodinâmico de 21 ± 1 nm a 70 °C.

Tabela 8: Valores do diâmetro hidrodinâmico (D_h) e temperaturas de dissociação e desnaturação, para a oxi- e cianometa-HbGp no pH 7,0 e 5,0, nas concentrações de SDS indicadas.

[oxi-HbGp] (mg/mL)	[SDS] (mmol/L)	$\langle D_h \rangle_{\text{inicial}}$ (nm)	T_{diss} (°C)	$\langle D_h \rangle_{\text{min}}$ (nm)	T_{den} (°C)	$\langle D_h \rangle_{\text{den}}$ (nm)
Oxi-HbGp pH 7,0						
0,5	0,0	27±1	-	-	52 ± 1	247±2
	0,2	27±1	49±1	18±1	52 ± 1	233±3
	0,4	27±1	41±1	17±1	53 ± 1	60±2
	0,6	27±1	37±1	12±1	50 ± 1	21±1
3,0	0,0	27±1	-	-	51±1	388±4
	0,2	27±1	50±1	26±1	52±1	288±5
	0,4	27±1	49±1	24±1	53±1	248±3
	0,6	27±1	45±1	20±1	54±1	72±1
Oxi-HbGp pH 5,0						
0,5	0,0	28±1	-	-	55 ± 1	5527±1000
	0,05	30±1	-	-	53 ± 1	2540±800
	0,1	29±1	-	-	47 ± 1	8020±2000

$\langle D_h \rangle_{\text{inicial}}$ é o diâmetro hidrodinâmico da oxi-HbGp a 25 °C; T_{diss} é a temperatura em que a oxi-HbGp sofre dissociação oligomérica; $\langle D_h \rangle_{\text{diss}}$ é o diâmetro hidrodinâmico da oxi-HbGp dissociada; $\langle D_h \rangle_{\text{min}}$ é o menor valor de diâmetro hidrodinâmico alcançado pela proteína dissociada; T_{den} é a temperatura em que o diâmetro hidrodinâmico da oxi-HbGp aumenta drasticamente; $\langle D_h \rangle_{\text{den}}$ é o diâmetro hidrodinâmico da oxi-HbGp a 70 °C (Fig.19).

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

Estudos com a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, pH 7,0, mostram que, na ausência de SDS, a proteína desnatura em temperaturas acima de 51 ± 1 °C, com a formação de agregados grandes com D_h de 388 ± 4 nm a 70 °C (Tabela 8), sendo consistente com estudos anteriores [13-15]. Na presença de 0,2 mmol/L de SDS, a proteína apresenta uma ligeira diminuição de D_h a 50 °C, sugerindo a dissociação parcial da oxi-HbGp antes da desnaturação a 52 °C. Com 0,4 e 0,6 mmol/L de surfactante, a dissociação oligomérica da oxi-HbGp é mais pronunciada começando em 49 ± 1 °C e 45 ± 1 °C, respectivamente. No entanto, a dissociação oligomérica não é completa antes da

desnaturação, uma vez que os valores de $\langle D_h \rangle_{\min}$ da forma dissociada são 24 ± 1 e 20 ± 1 nm para 0,4 e 0,6 mmol/L de SDS, respectivamente. Esses valores de $\langle D_h \rangle_{\min}$, são consideravelmente maiores do que aqueles obtidos para 0,5 mg/mL de proteína e também aqueles obtidos para a proteína totalmente dissociada em pH alcalino [14]. Portanto, esses resultados sugerem que para a oxi-HbGp, 3,0 mg/mL, os processos de dissociação e desnaturação se sobrepõem com o aumento da temperatura. Além disso, o tamanho do agregado formado pela proteína desnaturada a 70 °C se torna menor com o aumento da concentração de SDS (Tabela 8). Essa diminuição do D_h da forma desnaturada está de acordo com o fato da dissociação oligomérica dificultar a formação de agregados grandes, e o SDS atuar como inibidor de agregação, tornando a proteína na forma desnaturada mais solúvel [25,67-70].

4.7.2 pH 5,0

No pH 5,0 (Fig. 19B e Tabela 8), a oxi-HbGp apresenta um ligeiro aumento no valor de D_h de 28 ± 1 nm na ausência, é de $29-30 \pm 1$ nm quando na presença de SDS a 25 °C. Esse ligeiro aumento no valor de D_h é atribuído a ligação do SDS na oxi-HbGp, que encontra-se na forma íntegra [67,70]. Na ausência de surfactante a oxi-HbGp possui temperatura de desnaturação de 55 ± 1 °C (Fig.19B e Tabela 8). A desnaturação envolve a formação de agregados grandes alcançando um tamanho de 5527 ± 1000 nm a 70 °C (Tabela 8). Além disso, na faixa de temperatura entre 62 e 66 °C ocorre a sedimentação de parte desses agregados formados, levando a uma oscilação no diâmetro hidrodinâmico das partículas em solução (Fig. 19B). A formação desses agregados grandes de proteína desnaturada com o aumento da temperatura é favorecida pela proximidade do pH 5,0 com o ponto isoelétrico da oxi-HbGp ($pI=5,5$, [13]).

Na presença de 0,05 e 0,1 mmol/L de SDS, a oxi-HbGp apresenta uma pequena diminuição de estabilidade, com valores de T_{den} de 53 ± 1 e 47 ± 1 °C, respectivamente (Tabela 8). Além disso, o processo de desnaturação térmica leva à formação de agregados, assim como, à sedimentação parcial dos mesmos, observado pela diminuição de D_h entre 58 e 66 °C (Fig. 19B). Essas observações sugerem que o SDS promove a formação de agregado de oxi-HbGp desnaturada, provavelmente através da neutralização de parte das cargas positivas na superfície da proteína, tendo em vista que a proteína encontra-se num pH um pouco abaixo do seu pI [13,24,25].

4.8 Estabilidade térmica da oxi-HbGp, na presença de SDS, em pH ácido, neutro e alcalino, monitorada por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

4.8.1 pH 7,0

Nas Figuras 20A e 20C são mostradas as curvas de SAXS, com os respectivos ajustes obtidos usando o programa GNOM, para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, pH 7,0, na presença de 0,2 (Fig. 20A) e 0,4 mmol/L de SDS (Fig. 20C), em função da temperatura. Além disso, nas Figuras 20B e 20D, são apresentadas as curvas da função de distribuição $p(r)$, obtidas através dos ajustes mostrados nas Figuras 20A e 20C. Os parâmetros estruturais, raio de giro (R_g), dimensão máxima D_{max} e valor de intensidade $I(0)$ no $q=0$, obtidos com as análises das curvas de espalhamento (Figs. 20A e 20C), usando o programa GNOM, encontram-se reunidos na Tabela 9. A 20 °C, a curva de SAXS indica que a oxi-HbGp encontra-se íntegra [17,59], devido à presença dos três ombros bem definidos, na região de q igual a $0,04 \text{ \AA}^{-1}$, $0,07 \text{ \AA}^{-1}$ e $0,12 \text{ \AA}^{-1}$, respectivamente, na presença de 0,2 mmol/L de SDS (Fig. 20A). A oxi-HbGp, a 20 °C, também apresenta $p(r)$ com a contribuição de uma única partícula e valores de R_g e D_{max} compatíveis com a forma íntegra, de 107 ± 1 e $300 \pm 10 \text{ \AA}$, respectivamente (Figs. 20B, 20D e Tabela 9).

Com o aumento da temperatura, a oxi-HbGp, na presença de 0,2 mmol/L de SDS, mantém-se estável até 50 °C, não havendo mudanças significativas na intensidade da curva de espalhamento e dos ombros característicos da forma íntegra, nem nos parâmetros estruturais $R_g=107 \pm 1 \text{ \AA}$ e $D_{max}=300 \pm 10 \text{ \AA}$, respectivamente. As curvas de $p(r)$ também não mudam, corroborando que a oxi-HbGp mantém-se íntegra nessa temperatura (Fig. 20B). Em 60 °C a curva de SAXS apresenta uma diminuição da intensidade em q mínimo, assim como, dos ombros característicos da forma íntegra (Fig. 20A). Essas mudanças indicam que a oxi-HbGp sofre desnaturação nessa temperatura. A desnaturação é acompanhada pelo aumento significativo nos valores de R_g para $134 \pm 4 \text{ \AA}$, assim como, de D_{max} para $450 \pm 10 \text{ \AA}$ (Tabela 9). Os valores de $I(0)$ diminuem com o aumento da temperatura, sendo a diminuição significativa entre 50 e 60 °C, de $0,12 \pm 0,01$ para $0,082 \pm 0,004$. Essa diminuição do $I(0)$ pode ser atribuída à dissociação oligomérica da oxi-HbGp, que nesse caso, é seguida pela desnaturação [67]. Entretanto, as curvas de $p(r)$ não mostram a contribuição de partículas pequenas com o aumento da temperatura (Fig. 20B). A ausência da contribuição de partículas pequenas nas curvas de $p(r)$ sugere que os processos de dissociação/desnaturação praticamente sobrepõem-se, não havendo assim uma separação clara entre os mesmos. Essa

sobreposição da dissociação/desnaturação provavelmente tem influência da concentração de proteína como mostram os estudos de DLS reportados na seção 4.7.1. Dessa forma, é provável que a existência de uma pequena fração de proteína dissociada não seja detectada devido à concentração de proteína ser relativamente alta, assim como por uma limitação da técnica que possui baixa resolução.

Figura 20: Curvas de SAXS para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, pH 7,0, na presença de (A) 0,2 e (C) 0,4 mmol/L de SDS. (B) e (D) Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$, correspondentes aos ajustes das curvas mostradas em (A) e (B), obtidas usando o programa GNOM.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

Na concentração 0,4 mmol/L de SDS, a 20 °C, a oxi-HbGp também possui curva de SAXS característica da forma íntegra, assim como, os parâmetros estruturais R_g e D_{max} (Tabela 9). Entretanto, o valor de $I(0)$ a 20 °C é um pouco menor comparado ao valor obtido na concentração 0,2 mmol/L de surfactante, sugerindo que pode haver uma dissociação parcial da oxi-HbGp nessas condições (Tabela 9). Com o aumento da temperatura uma diminuição gradual do $I(0)$ é observada, alcançando o valor $0,08 \pm 0,01$, a 60 °C. Essa diminuição gradual do $I(0)$ sugere um crescente grau de dissociação induzido pelo aumento da temperatura, e em 60 °C os valores de R_g e D_{max} aumentam expressivamente, indicando que a proteína encontra-se desnaturada nessa temperatura (Tabela 9).

Tabela 9: Valores de R_g (Å), D_{max} (Å) e $I(0)$ (a.u.) para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, obtidos usando o programa GNOM, nas concentrações de SDS e temperaturas indicadas.

[SDS], mmol/L	T (°C)		pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
0.2	20	R_g	108 ± 1	107 ± 1	105 ± 1
		D_{max}	300 ± 10	300 ± 10	290 ± 10
		$I(0)$	$0,15 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$0,046 \pm 0,001$
	40	R_g	108 ± 1	107 ± 1	94 ± 1
		D_{max}	300 ± 10	300 ± 10	270 ± 10
		$I(0)$	$0,14 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$0,015 \pm 0,001$
	50	R_g	108 ± 1	107 ± 1	34 ± 2
		D_{max}	300 ± 10	300 ± 10	120 ± 10
		$I(0)$	$0,13 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,002 \pm 0,001$
	60	R_g	108 ± 1	134 ± 4	**
		D_{max}	500 ± 15	450 ± 10	**
		$I(0)$	$0,16 \pm 0,01$	$0,082 \pm 0,004$	**
0.4	20	R_g	128 ± 9	108 ± 1	101 ± 1
		D_{max}	450 ± 10	300 ± 10	290 ± 10
		$I(0)$	$0,15 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,033 \pm 0,001$
	40	R_g	131 ± 9	108 ± 1	90 ± 1
		D_{max}	475 ± 10	300 ± 10	265 ± 10
		$I(0)$	$0,15 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,008 \pm 0,001$
	50	R_g	136 ± 12	108 ± 2	32 ± 2
		D_{max}	515 ± 15	300 ± 10	115 ± 10
		$I(0)$	$0,15 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,002 \pm 0,001$
	60	R_g	208 ± 13	190 ± 7	**
		D_{max}	650 ± 20	630 ± 20	**
		$I(0)$	$0,17 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,01$	**

**Medidas não realizadas.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

4.8.2 pH 5,0

Em pH 5,0, a oxi-HbGp, na presença de 0,2 mmol/L de SDS, a 20 °C (Fig. 21A), apresenta curvas de SAXS similares ao pH 7,0 (Figs.20A e 20C), assim como, as curvas $p(r)$ mostradas na Figura 21B. Os valores de R_g , D_{max} e $I(0)$ também são similares, como pode ser observado na Tabela 9, sugerindo que o SDS não causa mudanças significativas na estrutura oligomérica da oxi-HbGp a 20 °C, neste pH. Com o aumento de temperatura, a oxi-HbGp se mantém estável até 50 °C, não apresentando mudanças nos parâmetros estruturais e na $p(r)$ (Tabela 9 e Fig. 21B). Em 60 °C, a HbGp apresenta um aumento expressivo nos valores de R_g , e D_{max} indicando que nessa temperatura a proteína forma agregados (Tabela 9). Tal fato pode ser também visualizado na curva $p(r)$ a 60 °C,

onde observa-se o surgimento de uma população de partículas com dimensões próximas a 400 Å (Fig. 21B).

Figura 21: Curvas de SAXS para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, pH 5,0, na presença de 0,2 (A) e 0,4 (C) mmol/L de SDS. (B) e (D) Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$, correspondentes aos ajustes das curvas mostradas em (A) e (C), obtidas usando o programa GNOM.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

Com 0,4 mmol/L de SDS, no meio ácido, a oxi-HbGp (Figs.21C e 21D) apresenta mudanças conformacionais expressivas no oligômero, devido às interações eletrostáticas com o surfactante, perceptíveis na curva $p(r)$ da Figura 21D, a 20 °C. Essas mudanças são também observadas analisando os valores de R_g e D_{max} , que são iguais a 128 ± 9 Å e 450 ± 10 Å, respectivamente. Esse aumento de R_g e D_{max} sugere que o SDS induz mudanças nas interações internas do oligômero da proteína, tornando a estrutura oligomérica menos compacta (Tabela 9). O aumento da temperatura induz o crescimento das partículas em solução a partir de 50 °C, com R_g de 136 ± 12 Å e D_{max} de 515 ± 15 Å (Tabela 9). Na temperatura de 60 °C, o tamanho das partículas cresce consideravelmente, alcançando valores de R_g e D_{max} maiores, indicando a desnaturação da proteína com a formação de agregados maiores do que quando na presença de 0,2 mmol/L de SDS (Tabela 9). Nessa faixa de temperatura de 20 a 60 °C os valores de $I(0)$ se mantêm praticamente constantes, sugerindo que a oxi-HbGp, no meio ácido, na presença de SDS, não sofre dissociação oligomérica antes de desnaturar e formar agregados, com o aumento da temperatura [67].

4.8.3 pH 9,0

Nas Figuras 22A e 22B são apresentadas as curvas de SAXS e as curvas $p(r)$, respectivamente, para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, no pH 9,0, na presença de 0,2 mmol/L de SDS. As curvas apresentam perfil diferente comparadas as obtidas nos valores de pH 7,0 (Fig. 20) e 5,0 (Fig. 21), a 20 °C. A curva de espalhamento possui apenas um ombro associado a forma íntegra da proteína e pouco intenso. Além disso, a oxi-HbGp apresenta R_g de 105 ± 1 Å e $I(0)$ de $0,04 \pm 0,001$, que são menores em relação aos valores obtidos nos valores de pH ácido e neutro. Esses valores de R_g e $I(0)$ indicam que a oxi-HbGp se encontra parcialmente dissociada no meio alcalino. Esses resultados são consistentes com o fato que, a presença do SDS induz um maior grau de dissociação oligomérica da oxi-HbGp, devido o surfactante ser um agente que promove a dissociação, quando a proteína se encontra em pH acima do pI [13,19,25,67].

O aumento da temperatura promove o aumento do grau de dissociação oligomérica da oxi-HbGp, refletindo na diminuição dos valores de $I(0)$, R_g e D_{max} (Tabela 9). Na temperatura de 50 °C, a proteína apresenta R_g de 34 ± 2 Å, D_{max} de 120 ± 10 Å e $I(0)$ de $0,002 \pm 0,001$, sugerindo que a oxi-HbGp se encontra totalmente dissociada em solução (Tabela 9 e Fig. 22B).

Na presença de 0,4 mmol/L de SDS, no pH 9,0, a oxi-HbGp apresenta valores dos parâmetros R_g , D_{max} e $I(0)$ consideravelmente menores a 20 °C, evidenciando que a proteína se encontra mais dissociada (Tabela 9). O aumento da temperatura leva à completa dissociação da proteína e os valores de R_g , D_{max} e $I(0)$ são similares aos observados na concentração 0,2 mmol/L de surfactante (Tabela 9).

Figura 22: Curvas de SAXS para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, pH 9,0, na presença de 0,2 (A) e 0,4 (C) mmol/L de SDS. (B) e (D) Curvas de distribuição de distâncias $p(r)$, correspondentes aos ajustes das curvas mostradas em (A) e (B), obtidas usando o programa GNOM.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

4.9 Análises pelo gráfico de Kratky para oxi-HbGp, na presença de SDS, em diferentes valores de temperatura e pH

Os processos de desnaturação e agregação induzidos pela temperatura para a oxi-HbGp, na presença de SDS, em diferentes valores de pH, podem ser visualizados melhor pelos gráficos de Kratky, mostrados na Figura 23, para o pH 7,0 (Figs. 21A e 21B) e pH 5,0 (Figs. 23C e 23D). Os gráficos de Kratky mostram que, a 20 °C, a oxi-HbGp encontra-se enovelada, apresentando ombros característicos da forma íntegra em valores de q iguais a 0,015 $\text{\AA}$, 0,042 $\text{\AA}$, e 0,066 $\text{\AA}$, respectivamente. Esses ombros estão associados à organização da estrutura da oxi-HbGp em bicamada hexagonal (proteína íntegra [59,67]). O aumento da temperatura leva a perda desses ombros característicos da proteína íntegra (Figs 23A-23D). Na concentração de 0,4 mmol/L de SDS, de 60 °C, as curvas da oxi-HbGp pH 5,0 (Figs. 23C e 23D) mostram indícios da formação de agregados de proteína desnaturada em solução, pelas mudanças de intensidade dos ombros e mudanças de inclinação da curva em valor de q menor [59,67]. Essas observações corroboram com

os dados de R_g e D_{max} apresentados na Tabela 9. No pH 9,0, os gráficos de Kratky indicam que a oxi-HbGp não se encontra totalmente íntegra a 20 °C, devido a que os ombros característicos do estado enovelado serem menos intensos e a inclinação das curvas em valor de q menor é diferente (Figs. 23E e 23F), comparado ao pH 5,0 e 7,0 (Figs. 23A-23D). O aumento da temperatura leva à perda total dos ombros associados ao estado enovelado da oxi-HbGp, em 50 °C [67]. Essa perda completa dos ombros sugere que a proteína encontra-se totalmente desnaturada nessa temperatura em ambas concentrações de SDS (Figs. 23E e 23F).

Figura 23: Gráficos de Kratky para a oxi-HbGp, em diferentes temperaturas, em tampão fosfato-borato-acetato 20 mmol/L, na presença de 0,2 e 0,4 mmol/L de SDS. (A) e (B) pH 7,0, (C) e (D) pH 5,0, e (E) e (F) pH 9,0, respectivamente, nas temperaturas indicadas.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

Os gráficos de Kratky apresentados na Figura 23, mostram bem a diferença do processo de desnaturação térmica da oxi-HbGp, na presença de SDS, em diferentes valores de pH. Em pH ácido e neutro a dissociação oligomérica da oxi-HbGp, não é completa antes de formar agregados, uma vez que, o gráfico de Kratky ainda apresenta uma fração de sinal dos ombros do estado enovelado, a 60 °C. Os ombros da forma íntegra no gráfico de Kratky para a oxi-HbGp, em pH 9,0, apresentam

uma perda total, indicando que a proteína sofre dissociação oligomérica completa antes de desnaturar (Figs. 23E e 23F).

4.10 Dissociação oligomérica da oxi-HbGp no pH 7,0, na presença de SDS, em diferentes temperaturas, monitorada por DLS.

Estudos cinéticos usando DLS foram realizados com a oxi-HbGp, nas concentrações de 0,5 e 3,0 mg/mL, na presença de SDS, para obter informações adicionais sobre a estabilidade térmica e sobre o processo de dissociação oligomérica da proteína. Nesse estudo o diâmetro hidrodinâmico (D_h) da oxi-HbGp, nas concentrações de 0,5 e 3,0 mg/mL, e na faixa de concentração de SDS de 0,2 a 0,6 mmol/L e intervalo de temperatura de 40 a 54 °C, foi monitorado. O processo de dissociação oligomérica foi acompanhado através das curvas de distribuição por tamanho e pela variação do diâmetro hidrodinâmico da proteína, como discutido em detalhe a seguir.

A Figura 24 mostra as curvas de distribuição de tamanho, monitoradas pela intensidade de espalhamento, para a oxi-HbGp 0,5 mg/mL, na presença de 0,2 (Fig. 24A), 0,4 (Fig. 24B) e 0,6 mmol/L de SDS (Fig. 24C), a 40 °C. Inicialmente (0,0 h) um único pico centrado em 27 nm é observado para a oxi-HbGp nas três concentrações de SDS estudadas sugerindo que a proteína encontra-se na forma íntegra. Este diâmetro é característico de um sistema monodisperso de uma solução da oxi-HbGp íntegra, no pH 7,0 [13-15]. Com 0,2 mmol/L de SDS, a oxi-HbGp permanece estável, com um único pico, em todo o intervalo de tempo monitorado, como pode ser observado na curva de 26,4 h (Fig. 24A). Porém, na presença de 0,4 mmol/L de SDS, a oxi-HbGp mantém uma distribuição monodispersa por mais de 13 h, com o surgimento de um segundo pico, associado à uma espécie pequena, provavelmente, a subunidades dissociadas em 13,9 h (pico indicado pela seta na Fig. 24B). Esse pico associado à subunidades dissociadas torna-se mais intenso, indicando maior grau de dissociação da oxi-HbGp, permanecendo até o final do processo (Fig. 24B). Para a oxi-HbGp, na presença de 0,6 mmol/L de surfactante, o segundo pico na curva de distribuição associado à espécie dissociada, surge após 1,2 h de incubação (Fig. 24C). Além disso, a espécie dissociada apresenta contribuição idêntica na curva de distribuição com 1,8 h de incubação, e após 5,0 h o sistema volta a ser monodisperso novamente, apresentando somente um pico na curva de distribuição (Fig. 24C). No entanto, esse pico está centrado num valor de diâmetro hidrodinâmico menor do que o observado inicialmente, indicando que a oxi-HbGp se encontra dissociada em solução (Fig. 24C).

A oxi-HbGp a 42 °C, na faixa de concentração de SDS de 0,2 a 0,6 mmol/L, apresenta curvas de distribuição de tamanho similares aquelas mostradas na Figura 24. No entanto, o pico associado às espécies dissociadas surge em tempos bem menores, nas três concentrações de SDS estudadas (dados não mostrados).

Figura 24: Curvas de distribuição de tamanho para a oxi-HbGp 0,5 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L pH 7,0, a 40 °C. (A) 0,2, (B) 0,4 e (C) 0,6 mmol/L de SDS. As setas indicam o começo da dissociação (Figs. B e C), respectivamente.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

Para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, na presença de 0,6 mmol/L de SDS, e na faixa de temperatura de 40 a 54 °C, também, inicialmente (0,0 h), são observadas curvas de distribuição com um único pico em 27 nm, independente da temperatura (curvas não mostradas). Nas temperaturas 40 e 42 °C, as curvas de distribuição por tamanho mantêm-se inalteradas durante 32 h, indicando que a proteína é estável nessas condições. No intervalo de temperatura de 46 a 54 °C, ocorre o surgimento de pico associado à subunidades dissociadas em tempos progressivamente menores, com o aumento da temperatura. Também é importante mencionar que na presença de concentrações menores que 0,6 mmol/L de SDS, a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, no intervalo de temperatura de 40 a 54 °C, não apresenta dissociação oligomérica, mantendo uma curva de distribuição inalterada.

Na Figura 25 são mostradas as curvas de cinética de dissociação para a oxi-HbGp 0,5 mg/mL, a 40 °C (Figs. 23A e 23B), e a 42 °C (Figs. 25C e 25D), em concentrações de SDS crescentes. Na ausência de surfactante, a 40 °C, a oxi-HbGp se mantém estável por 16 h, e após 17 h incubada nessa temperatura, a proteína começa a agregar, com um aumento expressivo no diâmetro hidrodinâmico (Fig. 25A). Na presença de 0,2 mmol/L de surfactante, a oxi-HbGp apresenta uma ligeira diminuição de D_h após 7 h. Essa ligeira diminuição de D_h está, provavelmente, associada a uma dissociação parcial da oxi-HbGp (Fig. 25A). Na presença de 0,4 mmol/L de SDS, a proteína começa a sofrer dissociação oligomérica após 5 h de incubação, enquanto, que para a concentração 0,6 mmol/L de surfactante, a dissociação requer bem menos tempo para o início, e após 6 h, a oxi-HbGp encontra-se completamente dissociada (Fig. 25A). A dissociação oligomérica da oxi-HbGp é caracterizada pela diminuição do D_h e pelo o aumento do índice de polidispersividade (PDI, Fig. 25A e Tabela 10). A oxi-HbGp íntegra possui D_h de 27 nm e PDI de 0,01. Entretanto, quando a proteína dissocia, o diâmetro hidrodinâmico diminui para 10-13 nm e a polidispersividade aumenta, ficando entre 0,09 e 0,24, a 40 °C (Tabela 10). A 42 °C, a oxi-HbGp agrega mais rápido na ausência de SDS (Fig. 25C). Na presença de SDS, a oxi-HbGp apresenta PDI um pouco maior que a forma íntegra (Tabela 10).

As curvas de D_h versus tempo mostradas nas Figuras 25A e 25C foram convertidas em coeficiente de difusão (D_z (m^2cm^2)) em função do tempo (Figs. 25B e 25D). Essas curvas de coeficiente de difusão foram ajustadas usando a equação 13, como mostrado nas Figuras 25B e 25D. Os parâmetros cinéticos obtidos com esses ajustes são apresentados na Tabela 10. Na presença de 0,2 mmol/L de surfactante, a 40 °C, a oxi-HbGp dissocia muito pouco, impossibilitando que a curvas sejam ajustadas como nas demais concentrações de SDS (Fig. 25A). A oxi-HbGp apresenta coeficiente de difusão (D_p) crescente com o aumento da concentração de SDS e da temperatura, na faixa de $(2,48 - 2,60) \times 10^{-12} m^2s^{-1}$, no início do experimento (Tabela 10). Esse aumento de D_p com a concentração de SDS e a temperatura é consistente com a dissociação oligomérica parcial da oxi-HbGp induzida pelo surfactante, nessas condições [67].

Figura 25: Dissociação oligomérica da oxi-HbGp 0,5 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L pH 7,0, na presença de SDS, a 40 (Figs. A e B) e 42 °C (Figs. C e D).

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 111, p. 561– 570, 2013.

Na presença de 0,4 mmol/L de SDS, a 40 °C, a oxi-HbGp apresenta processo de dissociação lento com valor de constante igual a $(0,53 \pm 0,07) \times 10^{-4} s^{-1}$ e um D_h de 13 ± 1 nm na forma dissociada. Enquanto que, para 0,6 mmol/L de surfactante a proteína se dissocia completamente, apresentando D_h de 10 ± 1 nm e o valor da constante de dissociação é quatro vezes maior, de $(2,1 \pm 0,2) \times 10^{-1} s^{-1}$ [67].

A 42 °C, a oxi-HbGp apresenta também constante de dissociação crescente com o aumento da concentração de SDS, de $(1,14 \pm 0,03) \times 10^{-4} s^{-1}$ e $(1,76 \pm 0,06) \times 10^{-4} s^{-1}$, para 0,2 e 0,4 mmol/L de surfactante, respectivamente (Tabela 10). Com 0,6 mmol/L de SDS, a oxi-HbGp apresenta uma constante de dissociação de $(5,53 \pm 0,37) \times 10^{-4} s^{-1}$, quatro vezes maior do que em 0,2 mmol/L de surfactante, e duas vezes maior do que o maior valor obtido a 40 °C (Tabela 10). Portanto, a constante de dissociação da oxi-HbGp aumenta com o aumento da concentração de SDS e da temperatura, em pH 7,0, sendo a temperatura uma variável importante na determinação da velocidade do processo de dissociação oligomérica. Além disso, o aumento da constante de dissociação é acompanhado por um processo de dissociação mais completo da proteína, quando a concentração de SDS aumenta de 0,2 (19 ± 1 nm) para 0,6 mmol/L de surfactante (10 ± 1 nm) a 42 °C (Tabela 10). Os valores de D_h da oxi-HbGp dissociada na presença de 0,6 mmol/L de surfactante são similares aos valores obtidos em pH 8,0, a 48 °C, reportados em estudos anteriores ($D_h=10$ nm

[12]). Essa dissociação oligomérica da oxi-HbGp, na presença de surfactante, leva a oscilações no coeficiente de difusão da proteína dissociada, sendo essas oscilações de D_z (m^2s^{-1}), provavelmente, associadas à interação SDS-proteína dissociada (Figs. 25B e 25D).

Tabela 10: Parâmetros cinéticos para o processo de dissociação oligomérica da oxi-HbGp 0,5 mg/mL, pH 7,0, nas concentrações de SDS e temperaturas indicadas

T (°C)	[SDS], mmol/L	D_h (nm) ^a	PDI ^a	D_h (nm) ^b	PDI ^b	$D_p \times 10^{-12}$ (m^2s^{-1})	$D_\infty \times 10^{-12}$ (m^2s^{-1})	$k \times 10^{-4}$ (s^{-1})	R^2	N
40	0,0	28±1	0,01	-	-	-	-	-	-	150
	0,2	28±1	0,01	26±1	0,09	-	-	-	-	170
	0,4	28±1	0,01	13±1	0,02	2,48±0,02	4,97±0,03	0,53±0,07	0,98	150
	0,6	27±1	0,01	10±1	0,24	2,55±0,06	7,76±0,06	2,1±0,2	0,85	200
42	0,0	27±1	0,01	-	-	-	-	-	-	200
	0,2	28±1	0,01	19±1	0,22	2,48±0,02	3,97±0,03	1,14±0,03	0,96	210
	0,4	28±1	0,01	11±1	0,21	2,48±0,02	6,85±0,04	1,76±0,06	0,92	180
	0,6	27±1	0,05	10±1	0,29	2,60±0,08	6,93±0,04	5,5±0,4	0,83	150

D_h (nm)^a e PDI^a correspondem ao diâmetro hidrodinâmico inicial e a polidispersividade, respectivamente, em $t=0,0$ min. D_h (nm)^b e PDI^b correspondem ao diâmetro hidrodinâmico inicial e a polidispersividade, respectivamente, no final do experimento. D_p ($\times 10^{-12}\text{m}^2\text{s}^{-1}$) corresponde ao coeficiente de difusão inicial ($t=0,0$ min) obtido com os dados de DLS. R^2 é o fator de correlação do ajuste das curvas mostradas nas Figs. 25B e 25D. N é o número de pontos na curva experimental ajustada, usando a equação 13.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

As curvas de cinética de dissociação oligomérica para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, na presença de 0,6 mmol/L de SDS, em diferentes temperaturas, são mostradas na Figura 26. Esses dados mostram que a oxi-HbGp se mantém praticamente estável com D_h de 26-27 nm em todo o intervalo de tempo monitorado, a 40 e 42 °C (Fig. 26A). A pequena diminuição no tamanho entre 2,5 a 32 h, pode ser atribuída à dissociação parcial da proteína. Na faixa de temperatura de 46 a 54 °C, a dissociação oligomérica é mais extensa e ocorre em tempos menores com o aumento da temperatura (Fig. 26B). Entretanto, antes que a dissociação seja completada a oxi-HbGp começa a formar agregados em solução e esse processo de agregação também ocorre mais cedo com o aumento da temperatura (Fig. 25B). É provável, que os três fenômenos induzidos pela temperatura, dissociação oligomérica, desnaturação e agregação estejam ocorrendo simultaneamente. Também é importante observar que no intervalo de temperatura de 50 a 54 °C, a oxi-HbGp começa a sofrer o processo de desnaturação, na presença de SDS, como mostram os estudos de “melting” onde ocorre a superposição dos processos de dissociação, desnaturação e agregação com o aumento da temperatura (seção 4.7.1).

Figura 26: Dissociação oligomérica da oxí-HbGp 3,0 mg/mL, tampão fosfato 30 mmol/L pH 7,0, na presença de 0,6 mmol/L de SDS, nas temperaturas indicadas.

Fonte- Carvalho, J. W. P., Alves, F. R.; Batista, T.; Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Tabak, M. Sodium dodecil sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dyanamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561– 570, 2013.

Convém mencionar ainda que não é possível analisar as curvas de D_h do processo de agregação da oxí-HbGp na presença de 0,6 mmol/L de SDS, pelo modelo desenvolvido por Markossian et. al. [26,31] pela equação 14, devido ao sistema ser polidisperso no início do processo de agregação. Nesse caso, a ocorrência, simultaneamente, dos processos de dissociação, desnaturação e agregação geram um sistema polidisperso durante todo o processo. O modelo desenvolvido por Markossian et. al. é restrito a sistemas monodispersos, o que impossibilita uma análise quantitativa do processo de agregação usando as curvas mostradas na Figura 26B.

Capítulo 5

Conclusões

No presente capítulo são apresentadas as conclusões deste trabalho baseadas nos estudos de absorção óptica, CD, DLS e SAXS, realizados com a oxi-, meta- e cianometa-HbGp, nos diferentes valores de pH, na ausência e presença de SDS.

5.0 Conclusões

Os estudos por absorção óptica e CD mostram que a desnaturação da oxi- e cianometa-HbGp envolve o fenômeno de agregação em temperaturas maiores que 58 °C, em meio ácido. No pH 7,0, o processo de desnaturação térmica da oxi- e cianometa-HbGp ocorre com a formação de espécies oxidadas, como aquo-meta-HbGp e hemicromo. Além disso, a temperatura crítica de desnaturação é similar para as duas formas de HbGp. Além do mais, os estudos de cinética de agregação térmica da oxi-HbGp, na faixa de concentração 0,5-3,0 mg/mL no pH 7,0, monitorada por DLS, mostram que o processo de agregação se torna mais rápido com o aumento de temperatura. Esses resultados também mostram que a oxi-HbGp sofre uma dissociação parcial antes de agregar. Estudos de “melting “ por DLS mostram que o aumento da concentração de proteína leva a uma pequena diminuição de estabilidade térmica da meta-HbGp em pH 5,0, e o processo de desnaturação é seguido pela formação de agregados grandes. No pH 7,0, a temperatura de desnaturação apresenta uma pequena diminuição em relação ao pH 5,0. Entretanto, não ocorre variação da temperatura crítica com o aumento da concentração de proteína. Além disso, em pH 7,5 e 8,0, a meta-HbGp sofre dissociação oligomérica antes de desnaturar. Essa dissociação oligomérica não é completa e os processos de dissociação, desnaturação e agregação claramente se sobrepõem com o aumento da temperatura. A cianometa-HbGp possui comportamento similar com valores de temperatura crítica um pouco maiores. Contudo, no pH alcalino essa forma de HbGp dissocia menos do que a meta-HbGp, ou seja, é mais estável. Estudos por SAXS mostram que a oxi-, meta- e cianometa-HbGp 3,0 mg/mL permanecem praticamente estáveis no pH ácido, na faixa de temperatura de 20 a 60 °C. No pH 7,0 as três formas de HbGp mantêm-se estáveis até 50 °C, sofrendo desnaturação a 60 °C, caracterizada pelo aumento dos parâmetros R_g e D_{max} . Em pH alcalino, o aumento da temperatura induz a dissociação oligomérica da HbGp e a ordem de estabilidade observada foi: cianometa->oxi->meta-HbGp. As análises quantitativas da $p(r)$ experimental foram realizadas usando uma combinação linear das $p(r)$ teóricas obtidas da estrutura íntegra e de fragmentos isolados da estrutura cristalográfica da HbLt. Essas análises mostram que o aumento de temperatura e pH leva à diminuição da porcentagem de proteína íntegra, enquanto que a contribuição de dodecâmero e tetrâmero aumenta significativamente.

Os estudos por DLS com a oxi-HbGp 0,5 e 3,0 mg/mL, pH 7,0, na presença de SDS, mostram um processo de dissociação oligomérica crescente com o aumento da concentração de surfactante. No entanto, na concentração de 3,0 mg/mL, a oxi-HbGp não dissocia completamente antes de desnaturar, mostrando claramente que a dissociação, desnaturação e agregação se

sobrepõem. No pH 5,0, a oxi-HbGp apresenta diminuição de estabilidade térmica representativa na presença de SDS, sendo o processo de desnaturação seguido pela formação e precipitação parcial de agregados grandes. Além do mais, no pH 7,0, os estudos de SAXS mostram que a oxi-HbGp, na presença de SDS, sofre dissociação parcial antes de desnaturar formando agregados a 60 °C. No meio ácido, a agregação da oxi-HbGp começa a 20 °C, na presença de 0,4 mmol/L de SDS, com aumento gradual dos agregados em solução com o aumento da temperatura. No pH 9,0, a proteína encontra-se parcialmente dissociada, com valores consideravelmente menores de R_g , D_{max} e $I(0)$. O aumento da temperatura induz a dissociação completa da oxi-HbGp a 50 °C. Estudos de cinética de dissociação oligomérica da oxi-HbGp 0,5 mg/mL, na presença de SDS, mostram que a constante de dissociação aumenta com a temperatura e a concentração de surfactante. Entretanto, para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, o processo de dissociação é parcial e claramente ocorre a sobreposição de processos de dissociação, desnaturação e agregação em tempos menores com o aumento da temperatura.

6.0 Perspectivas

- a) Estudar a estabilidade térmica da oxi- e cianometa-HbGp, no pH 7,0, na presença de CTAC e SDS, usando a técnica de absorção óptica, com o objetivo de caracterizar melhor a formação da espécie oxidada (hemicromo), observada nos resultados de CD. Essa caracterização será realizada com base no máximo do comprimento de onda da banda de Soret, assim como, nas bandas características dessas espécies na faixa de 500 a 650 nm.
- b) Estudar a estabilidade térmica da oxi- e cianometa-HbGp, na ausência e presença de SDS e CTAC, nos valores de pH 7,0 e 5,0, monitorando a estrutura secundária através da técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) nos permitirá obter informações sobre as mudanças na estrutura secundária que ocorrem durante o processo de desnaturação e agregação.
- c) Estudar a estabilidade térmica usando fluorescência, com a oxi- e cianometa-HbGp, na ausência e presença de surfactante, em diferentes valores de pH, fornecerá informações sobre mudanças globais na proteína induzidas pela temperatura. Esses estudos serão complementares e ajudarão na interpretação dos dados de DLS e SAXS já coletados.
- d) Estudar a cinética de agregação com a oxi- e cianometa-HbGp, nos valores de pH 7,0, e 5,0, na presença de CTAC e SDS, em diferentes temperaturas, usando DLS e fluorescência. Esses estudos nos ajudarão a entender melhor os processos de dissociação e agregação através da obtenção de parâmetros cinéticos.
- e) Também será importante investigar futuramente a estabilidade térmica das subunidades, dodecâmero (*abcd*)₃, trímero (*abc*) e monômero *d*, isoladas da HbGp, na ausência e presença de surfactante, em diferentes valores de pH, usando, absorção óptica, fluorescência, DLS e FTIR. Não foi possível realizar tais estudos durante o doutorado pela limitação de tempo.

7.0 Referências

- [1] VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. Tradução de A.B.G. da Veiga. et all. 3ª ed. Porto Alegre. Artemed, 2006. 1616 p.
- [2] NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. Tradução de A. A. Simões e W.R.N. Lodi. New York: Almed, 2011. cap 6, p.159-188.
- [3] TABAK, M.; CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; BACHEGA, J. F. R.; SANTIAGO, P.S. Recent new characterizations on the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* and some other giants hemoglobins from different worms. In: INNOCENTIN, A. (Ed.) **Stoichiometry and research: the importance of quantity in biomedicine**. Rijeka, Croatia: In Tech, 2012. v. 1, p. 337-356.
- [4] CARVALHO, F. A. O., SANTIAGO, P. S., BORGES, J. C., TABAK, M. On the molecular mass of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: analytical ultracentrifugation reexamination. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 2, p. 257-263, 2009.
- [5] 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 Å. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 18, n. 1, p. 24-28, 2011.
- [6] 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, n. 11, p. 2144-2151, 2011.
- [7] ROYER, W. E.; KNAPP, J. E.; STRAND, K.; HEASLET, H. A. Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 297-304, 2001.
- [8] ROYER, W. E.; SHARMA, H.; STRAND, K.; KNAPP, J. E.; BHTRAVBHATLA, B. *Lumbricus* erythrocrucorin at 3.5 Å resolution: architecture of a megadalton respiratory complex. **Structure**, v. 14, n. 7, p. 1167-1177, 2006.
- [9] KUCHUMOV, A. R.; TAVEAU, J. C.; LAMY, J. N.; WALL, J. S.; WEBER, R. E.; VINOGRADOV, S. N. The role of linkers in the reassembly of the 3.6 MDa hexagonal bilayer hemoglobin from *Lumbricus terrestris*. **Journal of Molecular Biology**, v. 289, n.5, p. 1361-1374, 1998.
- [10] ROYER, W. E.; STRAND, K.; VAN HEEL, M.; HENDRICKSON, W. A. Structural hierarchy in erythrocrucorin, the giant respiratory assemblage of annelids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 13, p. 7107-7111, 2000.
- [11] VINOGRADOV, S. N. The stoichiometry of the four linker subunits of *Lumbricus terrestris* hemoglobin suggests an asymmetric distribution. **Micron**, v. 35, n. 1-2, p. 127-129, 2004.
- [12] OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Interaction of giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) with ionic surfactants: a MALDI-TOF-MS study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 111-119, 2008.

- [13] 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.
- [14] SANTIAGO, P. S.; MOURA, F.; MOREIRA, L. M.; DOMINGUES, M. M.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Dynamic light scattering and optical absorption spectroscopy study of pH and temperature stabilities of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 6, p. 2228-2240, 2008.
- [15] SANTIAGO, P. S.; DOMINGUES, M. M.; CARVALHO, J. W. P.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Thermal stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: determination of activation parameters by optical spectroscopic and differential scanning calorimetric studies. **Biophysical Chemistry**, v. 152, n. 1-2, p. 128-138, 2010.
- [16] SHARMA, P. K.; KUCHUMOV, A. R. CHOTTARD, G.; MARTIN, P. D.; WALL, J. S.; VINOGRADOV, S. N. The role of the dodecamer subunit in the dissociation and reassembly of the hexagonal bilayer structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 1-3, p. 8754-8762, 1996.
- [17] KREBS, A.; ZIPPER, P.; VINOGRADOV, S. N. Lack of size and shape alteration of oxygenated and deoxygenated *Lumbricus terrestris* hemoglobin? **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1297, n. 2, p. 115-118, 1996.
- [18] ROUSSELOT, M.; GUEN, D. L. E; CHABASSE, C.; ZAL, F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin. **FEBS Journal**, v. 273, n. 7, p. 1582-1596, 2006.
- [19] GELAMO, E. L.; ITRI, R.; TABAK, M. Small angle x-ray scattering (SAXS) study of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* effect of pH, iron oxidation state, and interaction with anionic SDS surfactant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 32, p. 33298-33305, 2004.
- [20] CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; BORGES, J. C.; TABAK, M. Molecular masses and sedimentation coefficients of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: alkaline oligomeric dissociation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 183-193, 2011.
- [21] TANFORD, C. **The hydrophobic effect-formation of micelles and biological membranes**. New York: John Wiley, 1991. 233 p.
- [22] HANSEN, J. H.; PETERSEN, S.V.; ANDERSEN, K.K.; ENGHILD, J. J. DAMHUS, T.; OTZEN, D. E. Stable intermediates determine proteins' primary unfolding sites in the presence of surfactants. **Biopolymers**, v. 91, n. 3, p. 221-231, 2009.
- [23] POLI, A. L.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M.; IMASATO, H. SDS (sodium dodecyl sulfate) effect on the autoxidation of the *Glossoscolex paulistus* giant extracellular hemoglobin: kinetic studies at pH 7.0 and 9.0. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 1, p. 96-104, 2006.

- [24] SANTIAGO, P. S.; MOREIRA, L. M.; DE ALMEIDA, E.V.; TABAK, M. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) upon interaction with cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants: dissociation of oligomeric structure and autoxidation. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1770, n. 4, p. 506-517, 2007.
- [25] OTZEN, D. E. Protein-surfactant interactions: a tale of many states. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1814, n. 5, p. 562-591, 2011.
- [26] 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.
- [27] SANTORO, M. M.; BOLEN, D. W. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl a-chymotrypsin using different denaturants. **Biochemistry**, v. 27, n. 21, p. 8063-8068, 1988.
- [28] 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.
- [29] KLOTZ, I. M.; YOUNG, T. F. **Introduction to chemical thermodynamics**. New York: W. A. Benjamin, 1964. 244 p.
- [30] CAMPOS, L. A. SANCHO, J. Native-specific stabilization of flavodoxin by the fmn co-factor: structural and thermodynamical explanation. **Proteins**, v. 63, n. 3, p. 581-594, 2006.
- [31] MARKOSSIAN, K. A.; KHANOVA, H. A.; KLEIMENOV, S. Y.; LEVISTSKY, D. I.; CHEBOTAREVA, N. A.; ASRYANTS, R. A.; MURONETZ, V. I.; SASO, L.; YUDIN, I. K.; KURGANOV, B. I. Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 45, n. 44, p. 13375-13384, 2006.
- [32] MERTENS, H. D.T.; SVERGUN, D. I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle x-ray solution scattering. **Journal of Structural Biology**, v. 172, n. 1, p. 128-141, 2010.
- [33] CARVALHO, J.W.P.; SANTIAGO, P.S.; BATISTA, T.; SALMON, C.E.G.; BARBOSA, L.R.S.; ITRI, R.; TABAK, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies. **Biophysical Chemistry**, v. 163 - 164, p. 44 - 55, 2012.
- [34] SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v.25, p. 495-503, 1992.
- [35] KONAREV, P. V.; PETOUKHOV, M. V.; VOLKO, V. V.; SVERGUN, D. I. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 39, p. 277-286, 2006.
- [36] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

- [37] 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.
- [38] VAN HOLD, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S.; Linear circular dichroism. In: VAN HOLD, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. (Ed.). **Principles of physical biochemistry**. New York: Prentice Hall, 1998. p. 410-448.
- [39] KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biophysica et Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1338, n. 2, p. 161-185, 1997.
- [40] 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, n. 1, p. 46-58, 2012.
- [41] SANTOS, N.C, CASTANHO, M.R.B. Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of *Tabacco mosaic virus*. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 3, p. 1541-1650, 1996.
- [42] PETTA, V.; MORADIAN-OLDAK, J.; YANNOPOULOS, S.N.; BOUROPOULOS, N. Dynamic light scattering study of an amelogenin gel-like matrix in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, v. 114, n.1, p. 308-314, 2006.
- [43] TAKEDA, K.; SASAOKA, H.; SASA, K.; HIRAI, H.; HACHIYA, K.; MORIYAMA, Y. Size and mobility of sodium dodecyl sulfate-bovine serum albumin complex as studied by dynamic light scattering and electrophoretic light scattering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 154, n.2, p. 385-392, 1992.
- [44] PÉREZ, J.; VACHETTE, P.; RUSSO, D.; DESMADRIL, M.; DURAND, D. T Heat-induced unfolding of neocarzinostatin, a small all- β protein investigated by small-angle x-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, n. 4, p. 721-743, 2001.
- [45] AYUSO-TEJEDOR, S.; GARCÍA-FANDIÑO, R.; OROZCO, M.; SANCHO, J.; BERNADÓ, P. Structural analysis of an equilibrium folding intermediate in the apoflavodoxin native ensemble by small-angle x-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 406, n. 4, p. 604-619, 2011.
- [46] SEMISTOTNOV, G.; KIHARA, H.; KOTOVA, N. V.; KIMURA, K.; AMEMIY, Y.; NIYOKAZU, N.; IKURA, T.; KUWAJIMA, K. Protein globalarization during folding. A study by syncontrom small-angle x-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 262, n. 4, p. 559-574, 1996.
- [47] GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small angle scattering of x-rays**. New York: Wiley, 1955. 258 p.
- [48] GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small angle x-ray scattering**. London: Academic Press, 1982. 515 p.
- [49] BARBOSA, L.R.S.; SPINOZZI, F.; MARIANI, P.; ITRI, R. Small angle x-ray scattering applied to proteins in solution. RUSO, J.; PIÑEIRO, Á. (Ed.) **Proteins in solution and at interfaces: Methods and applications in biotechnology and materials science**. John Wiley, Spain, 2013, v. 1, 49-72 p.

- [50] DROGHETTIA, E.; SUMITHRAN, S.; SONO, M.; ANTALÍK, M.; FEDURCO, M.; DAWSON, J. H.; SMULEVICH, G. Effects of urea and acetic acid on the heme axial ligation structure of ferric myoglobin at very acidic pH. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 489, n. 1-2, p. 68-75, 2009.
- [51] AGUSTINHO, S. C. M.; TINTO, M. H.; IMASATO, H.; TOMINAGA, T. T.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. Spectroscopic studies of the met form of the extracellular hemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1298, n. 2, p. 148-158, 1996.
- [52] TSURUGA, M.; MATSUOKA, A.; HACHIMORI, A.; SUGAWARA, Y.; SHIKAMA, K. The molecular mechanism of autoxidation for human oxyhemoglobin: tilting of the distal histidine causes nonequivalent oxidation in the β chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 15, p. 8607-8615, 1998.
- [53] ROBINSON, V. L.; SMITH, B. B.; ARNONE, A. A pH-dependent aquomet-to-hemichrome transition in crystalline horse methemoglobin. **Biochemistry**, v. 42, n. 34, p. 10113-10125, 2003.
- [54] BENJWAL, S.; VERMA, S.; ROHM, K.; GURSKY, O. Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. **Protein Science**, v. 15, n. 3, p. 635-639, 2006.
- [55] WEIJERS, M.; BARNEVELD, P. A.; COHEN STUART, M. A.; VISSCHERS, R. W. Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. **Protein Science**, v. 12, n. 12, p. 2693-2703, 2003.
- [56] SANCHEZ-RUIZ, J. M. Protein kinetic stability. **Biophysical Chemistry**, v. 148, n. 1-3, p. 1-15, 2010.
- [57] QUESADA-SORIANO, I.; GARCÍA-MAROTO, F.; GARCÍA-FUENTES, L. Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of *Schistosoma japonicum* glutathione s-transferase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, n. 5, p. 979-984, 2006.
- [58] SPENOZZI, F. MARIANE, P.; MICETIC, I.; FERRERO, C.; PONTONI, D.; BRLTRAMINI, M. Quarternary structure heterogeneity of oligomeric proteins: a SAXS and SANS study of dissociation products of *Octopus vulgaris* hemocyanin. **PLOS ONE**, v. 7, p. e49644, 2012.
- [59] 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.
- [60] HARGROVE, M. S.; ALSON, J. S. The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity. **Biochemistry**, v. 35, n. 35, p. 11310-11318, 1996.
- [61] GIEHN, L.; SVERGUN, D. I.; OTZEN, D. E.; VESTERGAARD, B. Low-resolution structure of a vesicle disrupting α -synuclein that accumulates during fibrillation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 8, p. 3246-3251, 2011.
- [62] CAMPANA, P. T.; BARBOSA, L. R. S.; ITRI, R. Conformational stability of peanut agglutinin using small angle x-ray scattering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 3, p. 398-402, 2011.

- [63] HASSAN, N.; BARBOSA, L. R.S.; ITRI, R.; RUSSO, J. M. Fibrinogen stability under surfactant interaction. **Journal Colloids and Interfaces Sciences**, v. 362, n. 1, p. 118-126, 2011.
- [64] SHANG, W.; IVANOV, I.; SVERGUN, D.I.; BORBULEVYCH, O.Y.; ALEEM, A.M.; STEHLING, S.; JANKUN, J.; KÜHN, H.; SKRZYPCZAK-JANKUN, E. Probing dimerization and structural flexibility of mammalian lipoxygenases by small-angle X-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 409 n.4, p. 654-668, 2011.
- [65] DE MARCO, V.; GILLESPIE, P. J.; LI, A.; KARANTZELIS, N.; CHRISTODOULOU, E.; KLOMPMAKER, R.; VAN GERWEN, S.; FISH, A.; PETOUKHOV, M.V.; ILIOU, M.S.; LYGEROU, Z.; MEDEMA, R.H.; BLOW, J.J.; SVERGUN, D.I.; TARAVIRAS, S.; PERRAKIS, A. Quaternary structure of the human Cdt1-Geminin complex regulates DNA replication licensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 47, p. 19807-19811, 2009.
- [66] SPINOZZI, F.; MACCIONI, E.; TEIXEIRA, C.V.; AMENITSCH, H.; FAVILLA, R.; GOLDONI, M.; DI MURO, P.; SALVATO, B.; MARIANI, P.; BELTRAMINI, M. Synchrotron SAXS studies on the structural stability of *Carcinus aestuarii* hemocyanin in solution. **Biophysical Journal**, v.85, n.4, p. 2661-2672, 2003.
- [67] CARVALHO, J.W.P., ALVES, F.R.; BATISTA, T.; CARVALHO, F.A.O.; SANTIAGO, P.S.; TABAK, M. Sodium dodecyl sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: dynamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS) studies, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2013. (in press)
- [68] ANDERSEN, K. K.; WESTH, P.; OTZEN, D. E. Global study of myoglobin–surfactant interactions, **Langmuir**, v. 24 n. 2, p. 399-407, 2008.
- [69] HANSTED, J. G.; WEJSE, P. L.; BERTELSEN, H.; OTZEN, D. E. Effect of protein–surfactant interactions on aggregation of β -lactoglobulin, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 5, p. 713-723, 2011.
- [70] TAKEDA, K.; SASAOKA, H.; SASA, K.; HIRAI, H.; HACHIYA, K.; MORIYAMA, Y. Size and mobility of sodium dodecyl sulfate-bovine serum albumin complex as studied by dynamic light scattering and electrophoretic light scattering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 154, n.2, p. 385-392, 1992.

8.0 APÊNDICE

8.1 Artigos relacionados com tese

8.1.1 Artigo I

International Journal of Biological Macromolecules 54 (2013) 109–118

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Thermal denaturation and aggregation of hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in acid and neutral media

José Wilson P. Carvalho^a, Francisco A.O. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Marcel Tabak^{a,*}

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Sancarlense, 400, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Registro, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 October 2012

Received in revised form

16 November 2012

Accepted 20 November 2012

Available online xxx

Keywords:

Extracellular hemoglobin

Glossoscolex paulistus

Denaturation and aggregation

DSC

AUC

DLS

ABSTRACT

The thermal denaturation and aggregation of the HbGp, in the oxy- and cyanomet-forms, was investigated by DSC, AUC, DLS, optical absorption and CD, in the pH range from 5.0 to 7.0. Oxy-HbGp has a denaturation process partially reversible and dependent on the temperature. DSC melting curve is characterized by a single peak with T_c value of 333.4 ± 0.2 K for oxy-HbGp, while two peaks with T_c values of 332.2 ± 0.1 and 338.4 ± 0.2 K are observed for cyanomet-HbGp, at pH 7.0. In acidic pH oxy- and cyanomet-HbGp are more stable showing higher T_c values and aggregation. AUC data show that, HbGp, at pH 7.0, upon denaturation, remains undissociated at 323 K, presenting oligomeric dissociation at 333 ($12 \pm 3\%$ of tetramer and $88 \pm 5\%$ of whole HbGp) and 343 K ($70 \pm 5\%$ of monomer and $30 \pm 2\%$ of trimer). DLS data show that the lag period before aggregation is dependent on the temperature and HbGp concentration. Optical absorption and CD results show that the increase of temperature leads to the oxy-HbGp oxidation and aggregation, above 331 K, in acidic pH. CD data, for HbGp, present a greater thermal stability in acid medium than at neutral pH, with similar T_c values for both oxidation forms. Our data are consistent with previous studies and represents an advance in understanding the thermal stability of oligomeric HbGp structure.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

8.1.2 Artigo II

Biophysical Chemistry 163–164 (2012) 44–55

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biophysical Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/biophyschem> On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studiesJosé Wilson P. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Tatiana Batista^a, Carlos Ernesto Garrido Salmon^c, Leandro R.S. Barbosa^d, Rosângela Itri^d, Marcel Tabak^{a,*}^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo/São Carlos, SP, Brazil^b Campus experimental de Registro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/Registro/SP, Brazil^c Departamento de Física, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil^d Instituto de Física, Universidade de São Paulo-São Paulo, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) was studied by DLS and SAXS.
- The thermal stability order is cyanomet- > oxy- > met-HbGp, at several pH values.
- Analyses of SAXS experimental curves were performed by GNOM and OLIGOMER.
- Experimental $p(r)$ curves were analyzed by a linear combination of HbLr fragments.
- Contributions from smaller fragments were observed at higher pH and temperature.

GRAPHICAL ABSTRACT

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2011

Received in revised form 4 February 2012

Accepted 6 February 2012

Available online 16 February 2012

Keywords:

Extracellular hemoglobin

Glossoscolex paulistus

Oligomeric dissociation

Thermal stability

DLS

SAXS

ABSTRACT

Glossoscolex paulistus hemoglobin (HbGp) was studied by dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS). DLS melting curves were measured for met-HbGp at different concentrations. SAXS temperature studies were performed for oxy-, cyanomet- and met-HbGp forms, at several pH values. At pH 5.0 and 6.0, the scattering curves are identical from 20 to 60 °C, and R_g is 108 Å, independent of the oxidation form. At pH 7.0, protein denaturation and aggregation occurs above 55 °C and 60 °C, for oxy and met-HbGp, respectively. Cyanomet-HbGp, at pH 7.0, is stable up to 60 °C. At alkaline pH (8.0–9.0) and higher temperature, an irreversible dissociation process is observed, with a decrease of R_g , D_{max} and $I(0)$. Analysis by $p(r)$, obtained from GNOM, and OLIGOMER, was used to fit the SAXS experimental scattering curves by a combination of theoretical curves obtained for HbLr fragments from the crystal structure. Our results show clearly the increasing contribution of smaller molecular weight fragments, as a function of increasing pH and temperature, as well as, the order of thermal stabilities: cyanomet- > oxy- > met-HbGp.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

8.1.3 Artigo III

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 111 (2013) 561–570

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Sodium dodecyl sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies

José Wilson P. Carvalho^a, Fernanda Rosa Alves^a, Tatiana Batista^{a,c},
Francisco Adriano O. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Marcel Tabak^{a,*}

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

^b Campus Experimental de Registro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Registro, SP, Brazil

^c Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2013

Received in revised form 10 June 2013

Accepted 28 June 2013

Available online xxx

Keywords:

Glossoscolex paulistus

Oligomeric dissociation

Thermal stability

DLS

SAXS

SDS

ABSTRACT

Glossoscolex paulistus (HbGp) hemoglobin is an oligomeric protein, presenting a quaternary structure constituted by 144 globin and 36 non-globin chains (named linkers) with a total molecular mass of 3.6 MDa. SDS effects on the oxy-HbGp thermal stability were studied, by DLS and SAXS, at pH 5.0, 7.0 and 9.0. DLS and SAXS data show that the SDS-oxy-HbGp interactions induce a significant decrease of the protein thermal stability, with the formation of larger aggregates, at pH 5.0. At pH 7.0, oxy-HbGp undergoes complete oligomeric dissociation, with increase of temperature, in the presence of SDS. Besides, oxy-HbGp 3.0 mg/mL, pH 7.0, in the presence of SDS, has the oligomeric dissociation process reduced as compared to 0.5 mg/mL of protein. At pH 9.0, oxy-HbGp starts to dissociate at 20 °C, and the protein is totally dissociated at 50 °C. The thermal dissociation kinetic data show that oxy-HbGp oligomeric dissociation at pH 7.0, in the presence of SDS, is strongly dependent on the protein concentration. At 0.5 mg/mL of protein, the oligomeric dissociation is complete and fast at 40 and 42 °C, with kinetic constants of $(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ and $(5.5 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectively, at 0.6 mmol/L SDS. However, at 3.0 mg/mL, the oligomeric dissociation process starts at 46 °C, and only partial dissociation, accompanied by aggregates formation is observed. Moreover, our data show, for the first time, that, for 3.0 mg/mL of protein, the oligomeric dissociation, denaturation and aggregation phenomena occur simultaneously, in the presence of SDS. Our present results on the surfactant-HbGp interactions and the protein thermal unfolding process correspond to a step forward in the understanding of SDS effects.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

8.2 Outras publicações durante o doutorado

8.2.1 Artigo I

International Journal of Biological Macromolecules 59 (2013) 333–341

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies

Francisco Adriano O. Carvalho, José Wilson P. Carvalho, Fernanda Rosa Alves, Marcel Tabak*

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2013
Received in revised form 24 April 2013
Accepted 25 April 2013
Available online xxx

Keywords:

Extracellular hemoglobin
HbGp
pH
Oligomeric dissociation
AUC
DLS

ABSTRACT

Glossoscolex paulistus (HbGp) extracellular hemoglobin is a giant oligomeric protein. It is constituted by 144 heme containing subunits and non-heme structures (linkers), with a total molecular mass of 3.6 MDa. AUC and DLS studies were developed for three HbGp forms, oxy-, met- and cyanomet-, at several pH values, in order to characterize the species in solution upon oligomeric dissociation. Isolated SEC fractions, trimer and dodecamer, are less stable as compared to the whole oxy-HbGp. The monomer **d** displays a large thermal stability up to 59 °C. Hydrodynamic properties of the isolated subunits are very similar to those described for them in the whole protein, in the presence of urea or at pH 10.0. The degree of HbGp oligomeric dissociation, in alkaline pH, depends significantly on the iron oxidation state. Also on the ligand coordinated to the heme iron. Thus, at pH 8.0, the oxy-HbGp is partially dissociated, while the met-form is fully dissociated. The cyanomet-HbGp remains undissociated. Our present results show that the effect of pH on the HbGp oligomeric stability is similar to that associated to the urea-induced unfolding. Simultaneous use of AUC and DLS allowed the characterization of the species in the SEC fractions of isolated HbGp subunits.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

8.2.2 Artigo II

International Journal of Biological Macromolecules 52 (2013) 340–348

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation modelFrancisco A.O. Carvalho^a, José Wilson P. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Marcel Tabak^{a,*}^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP, Brazil^b Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Registro, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2012

Received in revised form

22 September 2012

Accepted 25 September 2012

Available online xxx

Keywords:

Extracellular hemoglobin

HbGp

Urea

Oligomeric dissociation

AUC

SAXS

ABSTRACT

The urea effect on the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) stability was studied by analytical ultracentrifugation (AUC) and small angle X-ray scattering (SAXS). AUC data show that the sedimentation coefficient distributions curves $c(s)$, at 1.0 mol/L of urea, display a single peak at 57 S, associated to the undissociated protein. The increase in urea concentration, up to 4.0 mol/L, induces the appearance of smaller species, due to oligomeric dissociation. The sedimentation coefficients and molecular masses are 9.2 S and 204 kDa for the dodecamer $(abcd)_3$, 5.5 S and 69 kDa for the tetramer $(abcd)$, 4.1 S and 52 kDa for the trimer (abc) and 2.0 S and 17 kDa for the monomer d , respectively. SAXS data show initially a decrease in the $I(0)$ values due to the oligomeric dissociation, and then, above 4.0 mol/L of denaturant, for oxy-HbGp, and above 6.0 mol/L for cyanomet-HbGp, an increase in the maximum dimension and gyration radius is observed, due to the unfolding process. According to AUC and SAXS data the HbGp unfolding is described by two phases: the first one, at low urea concentration, below 4.0 mol/L, characterizes the oligomeric dissociation, while the second one, at higher urea concentration, is associated to the unfolding of dissociated species. Our results are complementary to a recent report based on spectroscopic observations.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

8.2.3 Artigo III

Process Biochemistry 46 (2011) 2144–2151

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MSFrancisco Adriano O. Carvalho^a, José Wilson P. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Marcel Tabak^{a,*}^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil^b Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus experimental de Registro, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 June 2011

Received in revised form 3 August 2011

Accepted 24 August 2011

Available online 31 August 2011

Keywords:

Extracellular hemoglobin

Glossoscolex paulistus

MALDI-TOF-MS

Electrophoresis

Subunits characterization

Subunits molecular masses

ABSTRACT

Further characterization of hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) subunits was performed based on SDS-PAGE, size exclusion chromatography (SEC) and MALDI-TOF-MS analysis. SDS-PAGE has shown a total of four linker chains, two quite intense and two of lower intensity. HbGp fractions (I–VI), obtained by size exclusion chromatography (SEC), from oligomeric dissociation at alkaline pH 9.6, were monitored. Fraction I is identical to the whole protein. The monomeric chains c, obtained from the trimer *abc* reduction, present four isoforms with MM 17,336 Da, 17,414 Da, 17,546 Da and 17,620 Da. Furthermore, the trimer subunit presents two isoforms, *T*₁ and *T*₂, with MM 51,200 ± 60 and 51,985 ± 50 Da, respectively. Based on SDS-PAGE, the linker chains seem to be distributed along the different fractions of the SEC chromatogram, appearing along the peaks corresponding to fractions I–V. The fraction IV contains, predominantly, trimers with some linkers contamination. The strong interaction of linker chains *L* with the trimers *abc*, makes it difficult to obtain these subunits in pure form. The monomer *d* in fraction VI appears to be quite pure, in agreement with previous studies.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Recent New Characterizations on the Giant Extracellular Hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* and Some Other Giant Hemoglobins from Different Worms

Marcel Tabak¹, Francisco A.O. Carvalho¹, José W.P. Carvalho¹,

Jose F.R. Bachega² and Patrícia S. Santiago^{1,3}

¹*Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP,*

²*Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP,*

³*Campus Experimental de Registro, UNESP, SP,*

Brazil

1. Introduction

Giant extracellular hemoglobins, also known as erythrocruorins, have been investigated as a model of extreme complexity in oxygen-binding heme proteins [1,2]. They are characterized by a very high molecular mass (MM) of several megadalton (MDa), and their oligomeric structure together with the crowded and protected heme environment are two of the main factors responsible for the high redox stability [3,4]. Superoxide dismutase (SOD)-like intrinsic activity, observed for hemoglobins of *Lumbricus terrestris* (HbLt) and of *Arenicola marina* (HbAm), is another important factor [5,6]. These hemoglobins present a highly cooperative oxygen binding and a peculiar behavior associated to their oligomeric dissociation into smaller subunits and possible rearrangement back into the native oligomeric structure [7,8].

Moreover, a strong motivation to study these giant hemoglobins is related to their potential use in medicine as blood substitutes. Studies have been performed in the past for HbLt [9], and are presently underway to test and validate the use of HbAm in this direction [6,10]. They seem to be very promising due to the lack of undesirable immunological reactions in tests with animals, explained by the absence of cell membranes as occurs with human hemoglobin in red blood cells [6,10]. Besides, the resistance to oxidation of extracellular hemoglobins, as noticed by their redox stability, is also an advantage as compared to the use of human hemoglobin in this medical application.

The giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) is similar to several homologous proteins described in the literature [11-14]. These extracellular hemoglobins are constituted by a large number of globin-like subunits containing heme groups with MM in the range 15-19 kDa. These globin subunits form monomers of 16 kDa (*d*) and disulphide bound hetero-trimers of 51-52 kDa (*abc*), linked by non-heme structures (24-32 kDa), named linkers (*L*) [12,13]. Recent partial characterization of MM of HbGp by matrix assisted laser

8.2.4 Capítulo de livro II

Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Review Article

Recent Res. Devel. Anal.Biochem., 5 (2013): 00-00 ISBN: 978-81-7895-599-5

0. Characterization of the oligomeric extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) and its subunits, in different solution conditions, by analytical ultracentrifugation (AUC)

Francisco A. O. Carvalho, José W. P. Carvalho and Marcel Tabak
Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

Abstract. In this chapter, a review is presented on the use of analytical ultracentrifugation (AUC) as the main technique, with complementary MALDI-TOF-MS, optical absorption, DLS, circular dichroism (CD), and SDS-PAGE electrophoresis, for the characterization of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp), in different solution conditions. Hydrodynamic data for HbGp and its isolated subunits, obtained at neutral and alkaline pH, in the presence of urea and surfactants, are presented. Extracellular hemoglobins represent the summit of oxygen binding proteins and are quite interesting, especially, considering their potential biomedical applications as blood substitutes. Our AUC data for HbGp, at pH 7.0, display a single species, with molecular mass (*MM*) and sedimentation coefficient of 3.6 MDa and 58.6 S, respectively, associated to the undissociated protein. MALDI-TOF-MS and SDS-PAGE data show that HbGp oligomeric structure is constituted by several subunits

Correspondence/Reprint request: Dr. Marcel Tabak, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil. E-mail: marcel@sc.usp.br