

**Estudo de transições durante o processo de
desenovelamento térmico da RNase A por meio
da calorimetria (DSC) e espectroscopia de
correlação bidimensional no infravermelho
médio (2D-IR)**

Aluna: Danúbia Batista Martins
Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio

São José do Rio Preto-SP

2011

Danúbia Batista Martins

Estudo de transições durante o processo de
desenovelamento térmico da RNase A por meio da
calorimetria (DSC) e espectroscopia de correlação
bidimensional no infravermelho médio (2D-IR)

Dissertação para a obtenção
do título de Mestre em
Biofísica Molecular junto
ao programa de Pós-
Graduação em Biofísica
Molecular do Instituto de
Biociências Letras e
Ciências Exatas da
Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de São José
do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
Professor Adjunto
UNESP-São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho
Pesquisador
USP-Ribeirão Preto

Prof. Dr. André Luiz Galo
Professor assistente Doutor
UNESP-São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 27 de maio de 2011

Martins, Danúbia Batista.

Estudo de transições durante o processo de desenovelamento térmico da RNase A por meio da calorimetria (DSC) e espectroscopia de correlação bidimensional no infravermelho médio (2D-IR) / Danúbia Batista Martins. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

72 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marinônio Lopes Cornélio

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bioquímica. 2. Biofísica molecular. 3. Correlação bidimensional. 4. Calorimetria. 5. Espectroscopia de infravermelho. I. Cornélio, Marinônio Lopes. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.33

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Resumo

Esse trabalho tem por objetivo estudar as transições conformacionais, induzidas termicamente, na Ribonuclease A. Esta abordagem foi realizada aplicando-se a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR), associando a técnica de análise de correlação bidimensional (2D- COS), variável-variável (VV) e *sample-sample* (SS). A partir dos dados de DSC determinamos a variação de entalpia do sistema (ΔH_{cal}) que foi de 587 kJ/mol. Também identificamos as temperaturas de pré (36, 39, 43, 49 e 59°C), pós transição (71°C) e temperatura de *melting* (65°C), além da determinação do ΔH_{cal} para cada uma das transições. A análise de correlação bidimensional *sample-sample* (SS) também foi capaz de identificar as mesmas temperaturas encontradas por DSC. Por sua vez, a análise de correlação bidimensional variável-variável (VV) descreveu a evolução conformacional das estruturas secundárias da proteína durante o desenovelamento térmico.

Palavras Chaves: Ribonuclease A; DSC; FT-IR; Espectroscopia de correlação bidimensional *Sample-sample* (SS 2D); Espectroscopia de correlação bidimensional *Variable-variable* (VV 2D).

Abstract

This work aims to study the thermally-induced conformational transitions in Ribonuclease A. This approach was performed by applying the technique of differential scanning calorimetry (DSC) and medium infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR), linking the technique of correlation analysis (2D-COS), variable-variable (VV) and sample -sample (SS). From DSC data determine the enthalpy change of the system (ΔH_{cal}) which was 587 kJ / mol. We identified the pre temperatures (36, 39, 43, 49 and 59 ° C), post transition (71 ° C) and melting temperature (65 ° C), besides determination of ΔH_{cal} for each transition. The two-dimensional correlation analysis sample-sample (SS) was also able to identify the same temperatures found by DSC. In turn, the two-dimensional correlation analysis of variable-variable (VV) described the conformation evolution of the protein secondary structures during thermal unfolding.

Keywords: Ribonuclease A; DSC; FT-IR; Sample-sample two-dimensional correlation spectroscopy (SS 2D); Variable-variable two-dimensional spectroscopy (VV 2D)

Abreviaturas

2D - *Two-Dimensional*

RNase A – Ribonuclease Pancreática Bovina A

Cp – Capacidade calorífica á pressão constante

CD – Dicroísmo Circular

FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

IR – *infrared*

T_m – *melting temperature*

DSC – *Differential Scanning Calorimetric*

SS – *sample sample*

VV – variável variável

T_m – *melting temperature*

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura tridimensional da RNase A com as pontes dissulfeto representadas pelas esferas de cor laranja, as hélices- α por vermelho, as folhas- β por amarelo e as voltas e aleatórias por verde (PDB – 5rsa).....	3
Figura 2: Esquema básico para a espectroscopia de correlação 2D (CLAUDETE FERNANDES PEREIRA, et al., 2006)	4
Figura 3: Ilustração esquemática do mapa variável – variável 2D síncrono (CLAUDETE FERNANDES PEREIRA, et al., 2006)	8
Figura 4: Ilustração esquemática do mapa variável – variável 2D assíncrono (CLAUDETE FERNANDES PEREIRA, et al., 2006)	10
Figura 5: Ilustração esquemática do calorímetro do DSC, onde temos a célula da amostra (tampão + proteína) e da referência (tampão), aquecedores e computador que controla a taxa de aquecimento.....	13
Figura 6 – Termograma da RNase A de 15 a 85°C, sem correção de linha de base (<i>baseline</i>) (curva preta) e a curva correspondente ao tampão (curva Vermelha).....	20
Figura 7: Termograma identificando a temperatura de transição principal em 65°C (indicado pela flecha).....	21
Figura 8: Espectro de DSC deconvoluído de 26 a 78°C, identificando o ΔH_{cal} das sete regiões no qual o espectro foi analisado, onde a soma das contribuições se sobrepõe a curva de DSC e as setas indicam o pico das gaussianas encontradas para cada temperatura.....	23
Figura 9: Espectro de DSC deconvoluído ampliado de 33 a 52°C, identificando as quatro primeiras transições obtidas do termograma. A curva correspondente a soma das contribuições sobrepõe a curva de DSC (curva preta), com as respectivas gaussianas referentes as temperaturas de 36°C, 39°C, ~ 43°C e ~ 49°C.....	24

Figura 10 – Regiões do termograma da RNase A correspondentes as temperaturas de ~ 36 (a), ~ 39 (b), ~ 43 (c) e ~ 49°C (d), antes da correção de linha de base.....	25
Figura 11: Espectro de infravermelho da banda amida I, de 1600 – 1700 cm ⁻¹ , da proteína RNase A para temperaturas de 26°C a 78°C.....	28
Figura 12: Espectro de correlação sample-sample (SS-2D) para as temperaturas de 26 á 78°C, com um ponto de transição indicado pela flecha.....	29
Figura 13: Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 26 á 78°C, com um ponto de transição indicado pela flecha.....	30
Figura 14: Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 26 á 64°C.....	31
Figura 15: Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 26 á 36°C.....	32
Figura 16: Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 32 á 42°C.....	32
Figura 17: Corte ortogonal SS - 2D para a RNase A para as temperaturas de 40 á 50°C.....	33
Figura 18: Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 66 á 78°C.....	34
Figura 19: VV - 2D síncrono para a primeira região.....	36
Figura 20: VV - 2D assíncrono para a primeira região.....	37
Figura 21: VV - 2D síncrono para a segunda região.....	38
Figura 22: VV - 2D assíncrono para a segunda região.....	39
Figura 23: VV - 2D síncrono para a terceira região.....	41
Figura 24: VV - 2D assíncrono para a terceira região.....	42
Figura 25: VV - 2D síncrono para a quarta região.....	44
Figura 26: VV - 2D assíncrono para a quarta região.....	45
Figura 27: VV - 2D síncrono para a quinta região.....	46

Figura 28: VV - 2D assíncrono para a quinta região.....	47
Figura 29: VV - 2D síncrono para a sexta região.....	48
Figura 30: VV - 2D assíncrono para a sexta região.....	49
Figura 31 – Sequência de aminoácidos (estrutura primária) e as estruturas secundárias formadas em cada região. Além disso temos indicadas as oito cisteínas da RNase A e as pontes dissulfeto indicadas pelas linhas tracejadas verdes (PDB-5rsa).....	51
Figura 32 – Estrutura tridimensional da RNase A com as pontes dissulfeto representadas pelas esferas, as estruturas secundárias de hélices- α , folhas- β , voltas- β e aleatórias e as pontes de hidrogênio em pontilhado.....	52

Sumário

Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Abreviaturas.....	iv
Lista de figuras.....	v
1- Introdução.....	1
2- RNase A.....	2
3- Espectroscopia de correlação bisimensional (2D).....	4
3.1- Espectro dinâmico.....	5
3.2- Cálculo do espectro de correlação VV - 2D síncrono.....	7
3.2.1 - Informações provenientes dos espectros de correlação VV - 2D síncrono.....	8
3.3 - Cálculo do espectro de correlação VV - 2D assíncrono.....	9
3.3.1- Informações provenientes dos espectros de correlação VV - 2D assíncrono.....	9
3.4- Cálculo do espectro de correlação SS - 2D síncrono.....	11
3.5- Aplicações.....	11
4- Calorimetria diferencial de varredura	12
5- Materiais e métodos.....	16
5.1- Preparação das soluções.....	17
5.2- Preparação da solução tampão e da RNase A.....	17
5.3- Espectro infravermelho	17
5.4- Correlação VV - 2D e SS - 2D.....	18
5.5- Dados de DSC.....	19
6- Resultados e Discussão.....	20
6.1- Análise de DSC.....	20
6.2- Desenovelamento térmico da RNase A.....	26
6.3- Análise de correlação <i>sample sample</i> (SS-2D)	28
6.4- Análise de correlação variável variável (VV-2D).....	35

6.4.1 - Primeira região.....	36
6.4.2 - Segunda região.....	38
6.4.3 - Terceira região.....	41
6.4.4 - Quarta região.....	44
6.4.5 - Quinta região	46
6.4.6 - Sexta região.....	48
7- Conclusão.....	54
8- Bibliografia.....	56

1 - Introdução

Ao passar das décadas, muitos esforços tem sido aplicados para o entendimento dos mecanismos do enovelamento proteico e principais interações que governam esse processo. Informações a nível molecular e estrutural durante esse processo nos possibilita compreender como as estruturas nativas são formadas e estabilizadas.

A Ribonuclease pancreática Bovina A (RNase A) é muito estudada, desde Anfinsen, por ser considerada uma enzima com estrutura nativa bem comportada, ou seja, possuindo cooperatividade, além da alta estabilidade proteica. Estudos descrevem o processo de enovelamento tal como o desenovelamento, como sendo um mecanismo de dois estados, implicando a ausência de estados intermediários (DIANE REINSTÄDLER, et al., 1996 e VLADIMIR P. DENISOV, et al., 1998). Mas diferentes técnicas indicaram a possível existência de temperaturas de pré e pós transições que podem servir de pontos de investigação do comportamento estrutural da proteína. Estudos de infravermelho com o RNase A indicam a existência de temperaturas de pré transição (45°C) e transição principal (66°C), além da determinação de mudanças das estruturas secundárias durante esse processo (Li-Xu Wang, et al., 2006).

Neste trabalho nós investigaremos a presença de possíveis pré, pós-transições e temperatura de transição principal do processo. Além disso, obteremos informações a nível estrutural da RNase A. Utilizamos da técnica de DSC que é muito aplicada em processos biológicos, por possuir alta sensibilidade para identificar temperaturas de transições, além de parâmetros termodinâmicos. Essas transições são regiões de mudanças de estados (sólido-líquido, entre outros) ou mesmo mudanças conformacionais (biomoléculas) do sistema em estudo, levando a uma nova conformação. Na desnaturação proteica, por exemplo, a proteína ao ser aquecida, passa por mudanças na sua estrutura tridimensional durante as transições, levando a mesma, ao estado desnaturado.

Além do DSC, utilizamos a análise de espectroscopia de correlação bidimensional no infravermelho médio (2D-IR). Esta técnica é

utilizada por facilitar a análise das bandas de infravermelho (IR) de proteínas, tornando mais evidentes contribuições do espectro ao longo de duas dimensões. Isso facilita a visualização de informações que estavam sobrepostas no espectro 1D.

Para uma análise 2D-IR, a proteína em estudo pode estar na presença de qualquer tampão (sulfato, Tris-HCl, entre outros), diluída em água deuterada (D₂O). O concentração proteica pode variar de 5 a ~ 30 mg/ml, independente da sua massa molecular. O 2D-IR pode ser aplicado tanto a proteínas na forma de tetrâmeros (Concanavalina A (JOSE L.R. ARRONDO, et al., 1988)) ou globulares (BSA (MURAYAMA K., et al., 2004)) entre outras.

O 2D baseia-se na teoria proposta por Noda (2004), que consiste na determinação dos espectros dinâmicos ($\tilde{\chi}(\nu, t)$) através das intensidades espectrais ($\chi(\nu, t)$) (obtidas diretamente do espectro de infravermelho), sob o efeito da perturbação externa. Com isso realizamos as análises de correlação VV-2D e SS-2D. A análise 2D variável- variável (VV - 2D) síncrono e assíncrono, tem o intuito de estabelecer a correlação entre diferentes estruturas secundárias da proteína, na região denominada amida I, sob o efeito da perturbação externa (temperatura). Já no caso da análise 2D *sample-sample* (SS - 2D), tem-se a correlação entre os estados de perturbação, que nos dão informações sobre as temperaturas de transições durante o desenovelamento proteico.

2 - RNase A

A Ribonuclease pancreática Bovina A (RNase A) é uma enzima responsável pela clivagem, na região central do RNA (endoribonuclease). É uma proteína muito estudada para processos de *folding*, *unfolding* e *refolding*, por ser pequena (124 resíduos), com massa molecular de 13,7 kDa e bem estável (temperatura de *melting* ~ 65°C) (LI-XU WANG, et al., 2008). Estudos de cristalografia desta proteína detectaram as seguintes estruturas secundárias presentes na sua forma nativa: 23% de hélice- α , 46% de folhas- β , 21% de voltas- β e 10% de estruturas aleatórias (LI-XU WANG, et al., 2008). Ela possui quatro

pontes dissulfeto (C40-C95, C65-C72, C58-C110 e C26-C84) que estabilizam sua estrutura terciária (WILLIAM J. WEDEMEYER, et al., 2000). Quando essas pontes são quebradas, a proteína é desnaturada e torna-se inativa (MICHAEL M. B., 1993). Mudanças na estrutura secundária, assim como, estrutura terciária da RNase A ocorrem na dependência de pH, temperatura, etc.

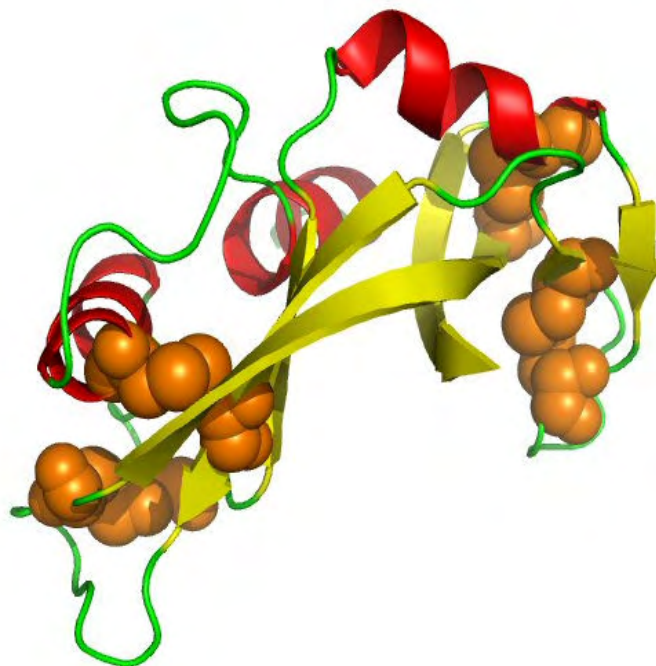


Figura 1 – Estrutura tridimensional da RNase A com as pontes dissulfeto representadas pelas esferas e as respectivas estruturas secundárias de hélices- α , folhas- β , voltas- β e aleatórias (PDB – 5rsa).

Christian B. Anfinsen foi um dos primeiros a estudar a RNase A, observando, *in vitro*, que na presença de desnaturante, a proteína se desnovele. Mas removendo-se o desnaturante, a proteína enovele-se espontaneamente. Com isso Anfinsen provou que a sequência de aminoácidos é determinante para a formação da estrutura terciária, e assim, do estado nativo (CHRISTIAN B. ANFENSEN, 1973). Estudos de desnaturação térmico foram realizados, sugerindo que o desenovelamento da RNase A é altamente cooperativa e que é um processo de dois estados (VLADIMIR P. DENISOV, et al., 1998 e JOAN TORRENT et al., 2001). No entanto, estudos usando NMR, espectroscopia Raman e também IR, sugerem a existência pré – desenovelamento, ou seja, sub transições, que são atribuídos á existência de estados intermediários, além da

transição principal (ponto de *melting*) (MICHAEL C. CHEN, et al., 1976, JING ZHANG, et al., 1995, YOUJIRO TAMURA, et al., 1995 e LI-XU WANG, et al., 2006). A Rnase A foi a enzima mais estudada do século 20 e ainda permanece sendo pesquisada (GARLAND R. M., et al., 2007).

3 - Espectroscopia de correlação bidimensional (2D)

A figura abaixo mostra o esquema básico para um experimento de espectroscopia de correlação 2D baseado em uma perturbação externa.

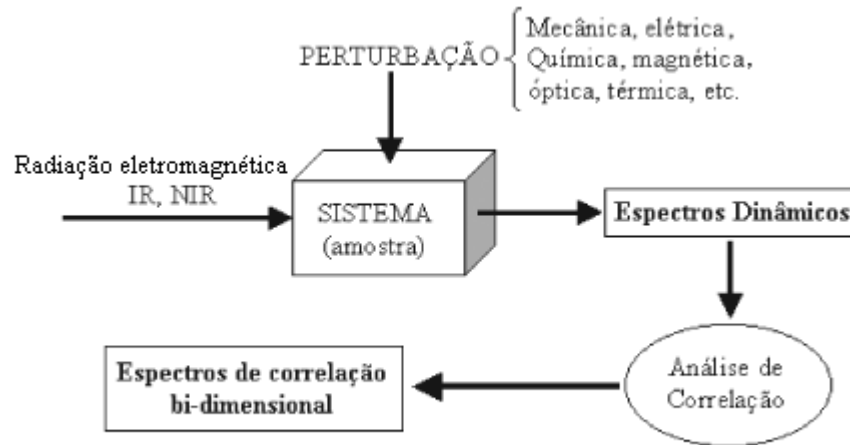


Figura 2 – Esquema básico para a espectroscopia de correlação 2D (CLAUDETE FERNANDES PEREIRA, et al., 2006).

Uma perturbação externa estimula o sistema (amostra) conduzindo a uma variação espectral. Essa variação espectral induzida pela aplicação da perturbação, fornece a chamada intensidade espectral. Essa é dada por $y(v, t)$ e observada para um intervalo da variável externa t entre $T_{\min}$ e $T_{\max}$ e v o número de onda. O espectro dinâmico $\tilde{y}(v, t)$ é definido a partir a intensidade espectral.

3.1 - Espectro dinâmico

O espectro dinâmico $\tilde{y}(v, t)$ de uma amostra afetada pela perturbação é definido como

$$\tilde{y}(v, t) = \begin{cases} y(v, t) - \bar{y}(v), & \text{para } T_{\min} \leq t \leq T_{\max} \\ 0, & \text{para qualquer outra situação} \end{cases} \quad (1)$$

Onde $y(v, t)$ é a intensidade espectral e $\bar{y}(v)$ é o espectro de referência da amostra ou sistema. O espectro de referência, por sua vez, pode ser um dos espectros ou o espectro médio definido por

$$\bar{y}(v) = \frac{1}{T_{max}-T_{min}} \int_{T_{min}}^{T_{max}} y(v, t) dt \quad (2)$$

O tipo de informação contida no espectro dinâmico depende do tipo de perturbação e do monitoramento empregado (técnica espectroscópica). A forma com que os dados são utilizados para os cálculos da análise de correlação e para construção dos espectros 2D, é na forma de matrizes. A matriz do conjunto de espectros dinâmicos (Matriz Y) será

$$Y = \begin{pmatrix} \hat{y}(v_1, t_1) & \hat{y}(v_2, t_1) & \hat{y}(v_3, t_1) & \dots & \hat{y}(v_n, t_1) \\ \hat{y}(v_1, t_2) & \hat{y}(v_2, t_2) & \hat{y}(v_3, t_2) & \dots & \hat{y}(v_n, t_2) \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \hat{y}(v_1, t_m) & \hat{y}(v_2, t_m) & \hat{y}(v_3, t_m) & \dots & \hat{y}(v_n, t_m) \end{pmatrix} \quad (3)$$

onde v_n corresponde a quantidade de variáveis espectrais (número de onda, medida em cm^{-1}) e t_m refere-se a quantidade de estados de perturbação (temperatura, por exemplo).

A partir dessa matriz m versus n , serão feitos os cálculos utilizando a notação matricial que será apresentada posteriormente, para a construção das duas formas de correlação 2D (*Sample – Sample* (SS-2D) e *Variável – Variável* (VV-2D)). Para o VV - 2D, temos a correlação entre os v_s , ou melhor, entre os números de onda, comprimento de onda, entre outros. Então, neste caso, temos uma matriz final (Y_{final}) de tamanho n versus n . Já para o caso do SS - 2D, temos a correlação entre as perturbações externas. Neste caso, a matriz final (Y_{final}) de tamanho m versus m (ISAO NODA, et al., 2002).

A correlação 2D nada mais é que uma comparação de variações de intensidade espectrais observadas em duas variáveis espectrais diferentes, sob um intervalo de observação finito entre T_{min} e T_{max} . Portanto, o espectro de correlação pode ser escrito na forma de produto escalar:

$$X(\nu_1, \nu_2) = \langle \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{y}(\nu_2, t) \rangle \quad (4)$$

Onde $X(\nu_1, \nu_2)$ é a intensidade de correlação 2D e os símbolos $\langle \rangle$, denotam qualquer classe de funções de correlação para comparar as duas intensidades em relação a t .

A função $X(\nu_1, \nu_2)$ é tratada convencionalmente como um número complexo

$$X(\nu_1, \nu_2) = \Phi(\nu_1, \nu_2) + i\Psi(\nu_1, \nu_2) \quad (5)$$

que compreende a dois componentes ortogonais conhecidos como intensidades de correlação síncrona e assíncrona, respectivamente. A correlação 2D síncrona $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ representa a similaridade entre as duas variações espectrais sob o efeito da perturbação externa. A correlação 2D assíncrona $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ pode ser considerada como a não-similaridade das variações espectrais entre ν_1 e ν_2 (ISAIO NODA, et al., 2004).

Existem dois tipos de correlação 2D que utilizaremos neste trabalho. A correlação variável – variável (VV-2D), que correlaciona as variáveis espectrais (ν , no caso, número de onda), indicando como que o sistema em estudo se comportam sob o efeito da perturbação externa. A partir dessa correlação, nesse trabalho, iremos obter informação sobre o comportamento conformacional das estruturas secundárias presentes na RNase A. A correlação *sample – sample* (SS-2D), diferentemente da VV-2D, correlacionará os estados de perturbação, ou seja, indicará como essas perturbações influenciaram o sistema em estudo, no nosso caso, a RNase A.

3.2 - Cálculo do espectro de correlação VV - 2D síncrono

Para um grupo de m espectros dinâmicos coletados durante o intervalo entre $T_{\min}$ e $T_{\max}$, ao longo da variável t em intervalos iguais, $\Delta t = (T_{\max} - T_{\min})/(m-1)$, a intensidade de correlação 2D síncrona é dada pela expressão:

$$\Phi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \tilde{y}_j(v_1) \tilde{y}_j(v_2) \quad (6)$$

onde $\tilde{y}_j(v_i)$ é o espectro dinâmico no ponto da variável física t_j , ou seja

$$\tilde{y}_j(v_i) = \tilde{y}_j(v_i, t_j) \quad i = 1, 2, \dots \quad (7)$$

Na forma de notação matricial

$$\Phi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} Y^T Y \quad (8)$$

onde Y^T refere-se a transposta da matriz Y .

3.2.1 - Informações provenientes dos espectros de correlação VV - 2D síncrono:

O espectro de correlação 2D síncrono representa mudanças de intensidade espectrais simultâneas ou coincidentes.

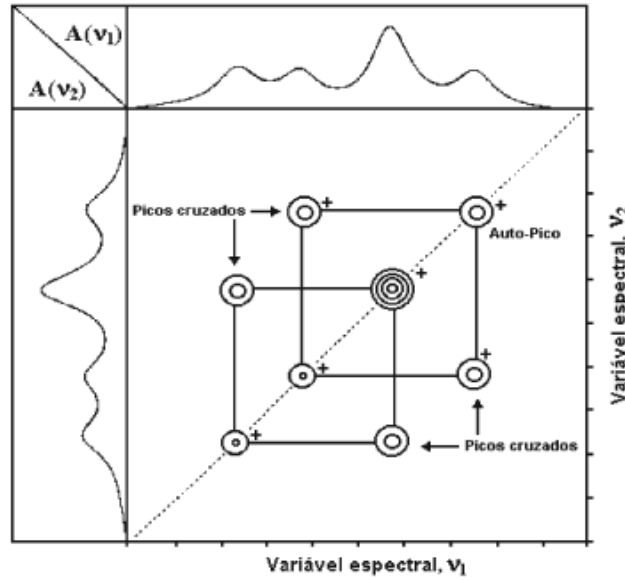


Figura 3 – Ilustração esquemática do mapa de contorno variável – variável 2D síncrono (CLAUDETE FERNANDES PEREIRA, et al., 2006).

É constituído por *auto-picos* (presentes na linha diagonal), cuja intensidade reflete as regiões do espectro que alteram sua intensidade sob efeito da perturbação externa e *picos cruzados* (localizados fora da diagonal), que informam sobre as mudanças de intensidade espectral entre duas variáveis espectrais diferentes v_1 e v_2 . Em um espectro 2D síncrono, picos cruzados negativos indicam que as

mudanças de intensidade observadas em duas coordenadas espectrais ocorrem em direções opostas, isto é, uma aumenta enquanto a outra diminui. Um pico cruzado positivo, por outro lado, indica que as mudanças de intensidade estão na mesma direção (ISAO NODA , et al., 2004).

3.3 - Cálculo do espectro de correlação VV - 2D assíncrono

O cálculo para o espectro de correlação 2D assíncrono é bem parecido com o cálculo 2D síncrono (equação 8), mas em diferencial pelo termo chamado de matriz de transformada de Hilbert – Noda (matriz N). Essa matriz é responsável por zerar a diagonal da matriz e evidenciar as correlações. A expressão da intensidade de correlação 2D assíncrona é dada por

$$\Psi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \tilde{y}_j(v_1) \cdot \sum_{k=1}^m N_{jk} \cdot \tilde{y}_k(v_2) \quad (9)$$

onde N_{jk} corresponde aos elementos da j -ésima linha e k -ésima coluna da matriz de transformação de Hilbert-Noda, os quais são dados por

$$N_{jk} = \begin{cases} 0 \text{ (zero)} & \text{se } j = k \\ 1 / \pi(k - j), & \text{em qualquer outra situação} \end{cases} \quad (10)$$

Como o 2D trabalha com matrizes, então uma notação matricial

$$\Psi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{N} \mathbf{Y} \quad (11)$$

onde $\mathbf{Y}^T$ refere-se a transposta da matriz $\mathbf{Y}$ e $\mathbf{N}$ é a matriz de Hilbert-Noda.

3.3.1 - Informações provenientes dos espectros de correlação VV - 2D assíncrono:

O espectro de correlação 2D assíncrono informa a não similaridade das respostas espectrais que ocorrem a partir da perturbação externa.

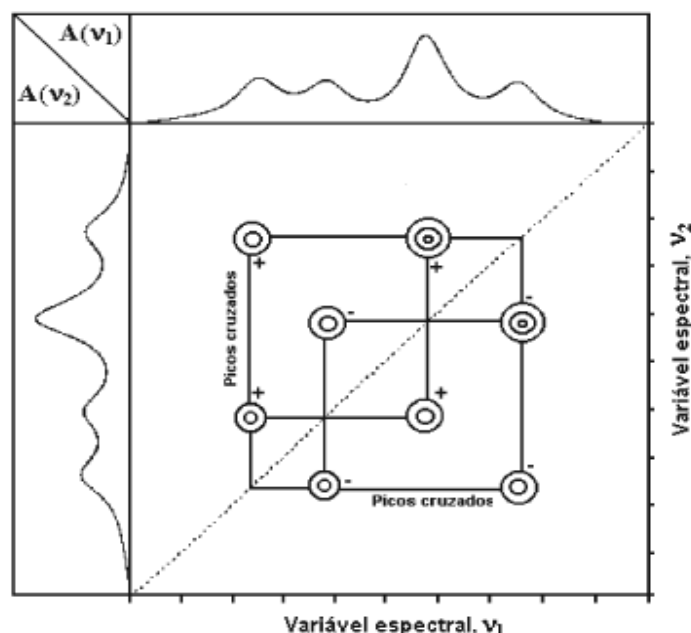


Figura 4 – Ilustração esquemática do mapa de contorno variável – variável 2D assíncrono (CLAUDETE FERNANDES PEREIRA, et al., 2006).

Esta informação manifesta-se na forma de picos que sempre são registrados fora da diagonal (linha tracejada) na figura 4. O sinal dos picos no mapa assíncrono revela a sequência na qual as mudanças de intensidades espectrais observadas para as variáveis v_1 e v_2 ocorrem em relação à perturbação. Nos picos cruzados, o sinal será positivo, se a alteração de intensidade espectral em v_1 ocorrer predominantemente antes da alteração da intensidade espectral em v_2 . O pico cruzado com sinal negativo indica que a alteração de intensidade espectral em v_2 ocorrer predominantemente antes da alteração da intensidade espectral em v_1 . A sequência dos eventos podem ser invertidas, caso os picos cruzados no espectro assíncrono forem influenciados por picos cruzados negativos do espectro síncrono (ISAO NODA, et al., 2004).

O outro tipo de correlação 2D que utilizaremos neste trabalho é a correlação *sample – sample* (SS - 2D), que correlaciona estados de perturbação, ou

seja, nos possibilita encontrar, no caso do desenovelamento térmico, a temperatura de transição principal e investigar possíveis temperaturas de pré e pós transições.

3.4 - Cálculo do espectro de correlação SS - 2D síncrono

Para um grupo de n espectros dinâmicos coletados durante o intervalo entre $T_{\min}$ e $T_{\max}$, ao longo da variável t em intervalos iguais, $\Delta t = (T_{\max} - T_{\min})/(n-1)$, a intensidade de correlação SS-2D síncrona é dada pela expressão, na forma matricial:

$$\phi(t_1, t_2) = \frac{1}{n-1} \mathbf{Y} \mathbf{Y}^T \quad (12)$$

Onde $\mathbf{Y}^T$ é a transposta da matriz $\mathbf{Y}$ (ŠAŠIC, S., et al., 2000 e ISAO NODA, et al., 2004).

3.5 – Aplicações

A espectroscopia de correlação 2D tornou-se, nos últimos anos, uma ferramenta bastante útil para interpretação de espectros obtidos nas regiões MIR, NIR e Raman (LIYAN YU, et al., 2008, ISAO NODA, et al., 2002 e LI-XU WANG, et al., 2008). Dentre os trabalhos publicados destaca-se a investigação de estruturas complexas como proteínas, polímeros e cristais líquidos, empregando as mais diferentes formas de estímulos para obtenção dos espectros 2D (por ex., temperatura, pressão, concentração, etc.) (HYE JEONG KIM, et al., 2005, JINGGANG ZHAO, et al., 2005 e JOAN TORRENT, et al., 2001). As investigações de processos de desnaturação de proteínas e estabilidade de estruturas poliméricas em função da variação de temperatura são os principais trabalhos encontrados na literatura (ISAO NODA, et al., 2004, JING ZHANG, et al., 1995 e MURAYAMA, K., et al., 2004).

4 - Calorimetria Diferencial de Varredura

Differential scanning calorimetry (DSC) é uma técnica de análise térmica que consiste no fluxo de calor e que contribui significativamente para identificação da estabilidade das macromoléculas. A habilidade para monitorar transições em proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, não é somente por prover dados da estabilidade termodinâmica, mas também é possível examinar detalhes desses processos e analisar as características de estados intermediários que envolvem o *unfolding/folding* das biomoléculas (CHARLES H. SPINK, 2008).

A identificação de transições é de suma importância pois nos permite analisar quais são e a quantidade de energia presente em cada uma dessas transições. É um método de análise muito usado na área de proteínas, aplicado á processos de desnaturação protéica (SPINK, et al., 2008; LADBURY, et al., 1998).

O calorímetro utiliza de uma alta sensibilidade para detectar pequenas variações de energia, associada ao processo de desenovelamento, por exemplo. A figura 5 esquematiza o calorímetro indicando as células da amostra e da referência, aquecedores e computador que controla a taxa de aquecimento e fluxo de calor.

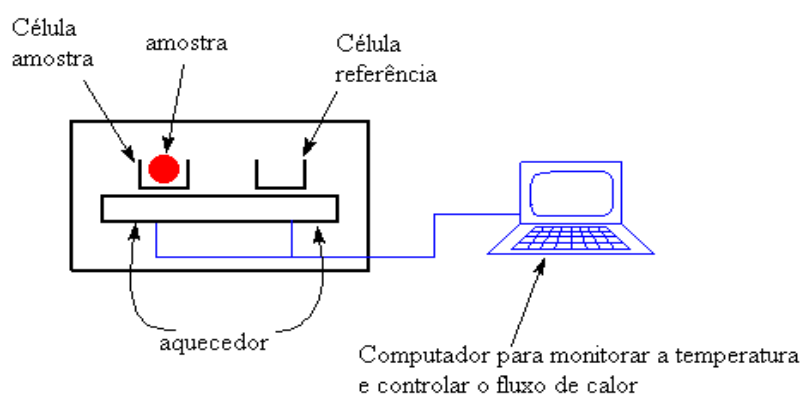


Figura 5 – Ilustração esquemática do calorímetro do DSC, onde temos a célula da amostra (tampão + proteína) e da referência (tampão), aquecedores e computador que controla a taxa de aquecimento.

Os dados obtidos pelo calorímetro são coletados pelo computador e apresentados na forma de fluxo de calor (em mW, por exemplo) *versus* temperatura e convertidos no chamado termograma (capacidade térmica à pressão constante (C_p) *versus* temperatura). O termograma refere-se a contribuição proteica. O pico evidente do termograma indica a temperatura de transição principal (T_m) e da área abaixo da curva do termograma determina-se a variação de entalpia (ΔH_{cal}) do processo em estudo (COOPER, et al., 1999; OLOFSSON, et al., 1998).

O parâmetro termodinâmico obtido é a entalpia. Ela consiste da energia que está disponível na forma de calor para o sistema. Essa energia pode formar ou quebrar ligações, em uma proteína, como ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto, ligações iônicas, entre outras. Quando $\Delta H < 0$, ocorre uma liberação de calor do sistema (proteína), chamado de reação exotérmica. Já quando $\Delta H > 0$, ocorre uma absorção de calor pelo sistema (proteína), chamado de reação endotérmica. Relacionando entalpia com a energia interna e o produto entre pressão e volume, (CALLEN, 1985 e COOPER, et al., 1999).

$$H = U + PV \quad (14)$$

sendo U a energia interna do sistema, P a pressão e V o volume (CALLEN, 1985).

Fazendo a diferencial

$$dH = dU + VdP + PdV \quad (15)$$

Partindo da primeira lei da termodinâmica, temos que $dU + PdV$ é dQ ,

$$dH = dQ + VdP \quad (16)$$

Quando em pressão constante ($P = \text{constante}$)

$$dH = dQ_p \quad (17)$$

Então temos que

$$\Delta H = Q_p \quad (18)$$

Portanto temos que a variação de entalpia (ΔH) é um indicativo da quantidade de energia, na forma de calor, presente no processo em estudo (COOPER, et al., 1999), que é responsável por mudanças de fase ou estruturais em macromoléculas, por exemplo.

Com os dados obtidos pelo DSC, iremos calcular a variação de entalpia de Van't Hoff, realizado da seguinte forma (CHARLES H. SPINK, 2008, FABRIZIA FOGLIA, et al., 2008, GUIDO BARONE, et al., 1997 e PETER L. PRIVALOV, et al., 1993)

$$\Delta H_{VH} = A R T_m^2 \frac{C_p}{\Delta H_{cal}} \quad (19)$$

Onde A é um fator referente ao modelo de dois estados, com valor igual a 4, R é a constante universal dos gases, T_m a temperatura de transição principal (pico do termograma), C_p a capacidade térmica a pressão constante no máximo (em T_m) e ΔH_{cal} a variação de entalpia determinada a partir do termograma. Com a determinação das duas entalpias (ΔH_{cal} e ΔH_{VH}), podemos compará-las. Quando $\Delta H_{cal} = \Delta H_{VH}$, temos um processo de apenas dois estados. Se $\Delta H_{cal} > \Delta H_{VH}$ podemos concluir a existência de um ou mais estados intermediários, enquanto se $\Delta H_{cal} < \Delta H_{VH}$ temos uma cooperação intermolecular (ALAN COOPER, 2001; CHARLES H. SPINK, 2008 e JULIAN M. STURTEVANT, 1987).

5 - Materiais e Métodos

Materiais utilizados para preparação das amostras e coletas de dados:

- Ribonuclease A (RNase A) (SIGMA[®] R4875-1G)(E.U.A.);
- Óxido de Deutério (D₂O) (ALDRICH[®] 293040) (E.U.A.);
- Tris (plusone 17-1321-01)(E.U.A.);
- Ácido clorídrico (HCl) (MERCK art.21603) (E.U.A.);
- Balança analítica (Toledo[®] do Brasil, modelo AR2140) (E.U.A.);
- Medidor de pH (CORNING ph meter 430) (E.U.A.);
- Porta amostra desmontável (HARRICK, modelo DLC-M25) (E.U.A.);
- Espaçador de 100µm (HARRICK, modelo MSP-056-M25) (E.U.A.);
- Janelas de CaF₂ (HARRICK, modelo WFD-U25, tamanho: 25 x 2mm) (E.U.A.);
- Banho térmico (THERMO, modelo NESLAB RTE 7)(E.U.A.);
- Termopar (DELL TECH) (E.U.A.);
- Espectrofotômetro Nicolet NEXUS 670 FT-IR (E.U.A.);
- Software Matlab 6 (E.U.A.);
- Software Ominic (E.U.A.);
- Software GRAMS[®] (E.U.A.);
- Software ORIGIN 7.0 (E.U.A.);
- Calorímetro (Microcal VP-DSC micro calorimeter)(E.U.A.).

5.1 - Preparação das soluções

Para a realização do experimento foi necessária a preparação de duas soluções. Uma contendo apenas o Tris-HCl em deutério (D₂O) que será referida como solução tampão e outra contendo Tris-HCl, deutério e a proteína em estudo, a qual será chamada de solução de RNase A.

5.2 - Preparação da solução tampão e da RNase A

O tampão Tris-HCl foi preparado em deutério à concentração 10mM e pD final de 8,4, para ao longo do aquecimento, mantermos o pH fisiológico. A relação entre pH e pD pode ser expressa pela seguinte equação (MURAYAMA, et al., 2004):

$$pD = pH + 0,4 \quad (20)$$

Para a solução de RNase A (grau de pureza > 99%), foi preparada uma quantidade da solução tampão (1mL) e dissolveu-se a quantidade de RNase A de aproximadamente 20 mg/ml. Com as duas soluções preparadas, foram deixadas *overnight*, para a obtenção da troca H/D, e realização das medidas de IR.

5.3 - Espectro infravermelho

O espectro infravermelho foi medido com um espectrofotômetro NEXUS 670 FT-IR Nicolet (E.U.A), purgado com nitrogênio (5L/min). A solução de proteína foi colocada entre um par de janelas de CaF₂ (fluoreto de cálcio), separadas com um espaçador de 100 µm e em seguida foi colocada em uma porta amostra desmontável cuja temperatura foi controlada por um banho térmico (THERMO, modelo NESLAB RTE 7) (E.U.A).

Realizamos 256 interferogramas (scans) para cada espectro com uma resolução espectral de 2 cm⁻¹. A temperatura da amostra foi controlada por um banho térmico (THERMO)(E.U.A.) e medida através de um termopar (DELL TECH)(E.U.A), ligado diretamente a janela de CaF₂ contendo a amostra em análise.

Alcançando-se a temperatura desejada, aguardou-se por 10 minutos para assegurar o equilíbrio térmico da amostra e então foi obtido o espectro. O espectro da solução tampão foi obtido sob condições idênticas às mencionadas acima e subtraído do espectro da proteína em cada temperatura correspondente, feito através do software GRAMS[®] (E.U.A). Este, além da subtração entre o espectro referência (Tris-HCl) e o espectro da proteína (Tris-HCl + RNase A), é responsável por realizar a correção de linha de base (*baseline*), para o conjunto de espectros nas respectivas temperaturas.

Medidas espectrais foram realizadas para as temperaturas de 26 a 78°C com ΔT igual a 2°C. Foi utilizado o software OMINIC[®] (E.U.A), que é responsável por coletar os dados vindos do espectrofotômetro, construindo o espectro entre 1700 a 1600 cm^{-1} , região denominada de amida I.

5.5 - Correlação VV - 2D e SS - 2D

A análise de correlação 2D – IR foi efetuada em um programa desenvolvido em plataforma MatLab (R2006a), utilizando a notação matricial proposta por Noda (ISAO NODA, et al., 2004). Realizamos uma correção de linha de base (*baseline*) nos espectros 1D, antes da realização da análise de correlação. Para os dados espectrais da RNase A aplicou-se, primeiramente, a análise de correlação *sample-sample* (SS – 2D), para a detecção de temperaturas de transições, pelas quais a proteína passa por variações conformacionais. As análises conformacionais das estruturas secundárias foram realizadas pela análise de correlação variável-variável (VV – 2D).

5.6 - Dados de DSC

Os dados de DSC foram coletados a partir do calorímetro (Microcal VP-DSC (E.U.A.)). A taxa constante de aquecimento foi de 6°C / h, na faixa de temperatura de 15 a 85°C. Foram coletados os dados da contribuição proteica, na mesma concentração utilizada para as medidas de infravermelho (20 mg/ml). A partir do termograma da RNase A, realizamos a correção de linha de base (*baseline*) da curva e a análise de deconvolução do termograma foi realizada no programa Origin 7.0 (E.U.A.).

6- Resultados e Discussão

6.1- Análise de DSC

Ao realizar a análise de DSC obtivemos o termograma da RNase A, sem correção de linha de base, e seu respectivo tampão, presente na figura 6.

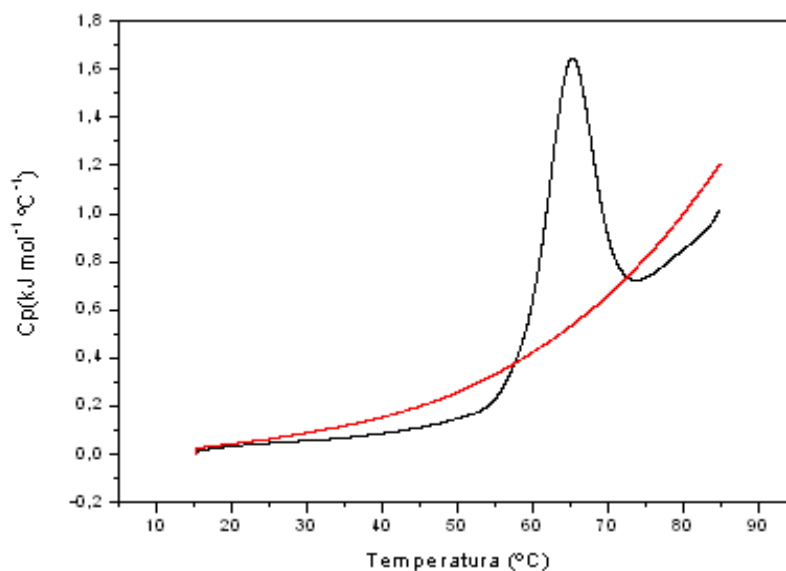


Figura 6 – Termograma da RNase A de 15 a 85°C, sem correção de linha de base (*baseline*) (curva preta) e a curva correspondente ao tampão (curva Vermelha).

Realizamos a subtração entre as curvas e posterior *baseline* (figura 7), permitindo assim a obtenção de parâmetros correspondentes ao desenovelamento da RNase A. O termograma obtido é característico de um processo de dois estados com um pico evidente á temperatura de $\sim 65^\circ\text{C}$, que corresponde a temperatura de transição principal da RNase A (LI-XU WANG et al., 2006).

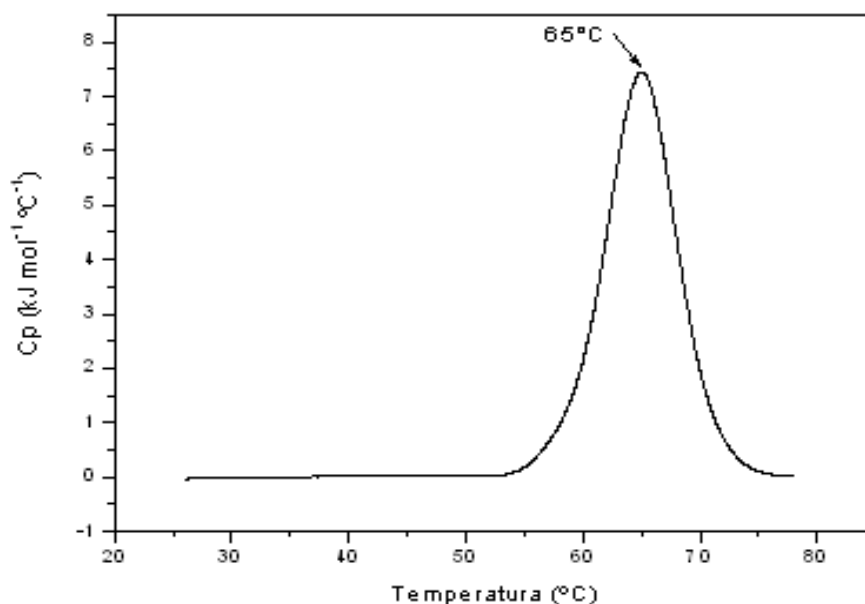


Figura 7 – Termograma identificando a temperatura de transição principal em 65°C (indicado pela flecha).

Realizamos a partir do termograma acima, uma integral da curva, para obtermos a entalpia do processo e identificamos o valor de aproximadamente 587 kJ mol⁻¹. Identificamos, então, que o processo de desenovelamento possui $\Delta H > 0$, indicando que a reação foi endotérmica, isso é, a proteína absorveu energia térmica para se desenovelar. Essa absorção é responsável pela quebra das ligações não covalentes que estabilizavam a estrutura nativa.

A partir do termograma de DSC, calculamos a variação de entalpia de Van't Hoff, realizada pela equação 19. Encontramos um $\Delta H_{VH} \sim 405 \text{ kJ mol}^{-1}$. Comparando a entalpia de Van't Hoff com a variação de entalpia do DSC ($\Delta H_{cal} \sim 587 \text{ kJ mol}^{-1}$), notamos que $\Delta H_{cal} > \Delta H_{VH}$ e um $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal} \sim 0,7$. O índice da razão entre as duas entalpias indica se o processo em estudo é de dois estados ($\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal} = 1$), ou múltiplos estados ($\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal} < 1$) (ALAN COOPER, 2001 e JULIAN M. STURTEVANT, 1987). Nesse trabalho, o valor de 0,7 é indicativo de que o desenovelamento térmico da RNase A é um processo com múltiplos estados (meta estados) e não com dois estados.

A partir disso, investigamos a possibilidade da existência de temperaturas de pré e pós transições, realizando uma deconvolução. Essa é uma análise muito utilizada em espectros de FTIR e CD para identificar a contribuição, no espectro de proteínas, das estruturas secundárias presentes (MURAYAMA, K. et al., 2004) e também muito usado nas análises de DSC, com o intuito de identificar possíveis contribuições que influenciam a curva de termograma, obtendo a variação de entalpia para cada contribuição (JULIAN M. STURTEVANT, 1974, MOSTAFA REZAEI-TAVIRANI, et al., 2006). Com a deconvolução obtivemos um ajuste de 0,99996 entre a curva experimental e a curva ajustada e identificamos as seguintes temperaturas de pré transições em 36, 39, 43 e 49 e 59°C, pós transição em 71°C, além da transição principal em ~ 65°C. Os respectivos valores entálpicos para cada temperatura foram também determinados.

A figura 8 mostra a deconvolução do termograma completo e na figura 9 temos o termograma ampliado, na região entre 33 a 52°C, que compreende as temperaturas de 36, 39, 43 e 49°C.

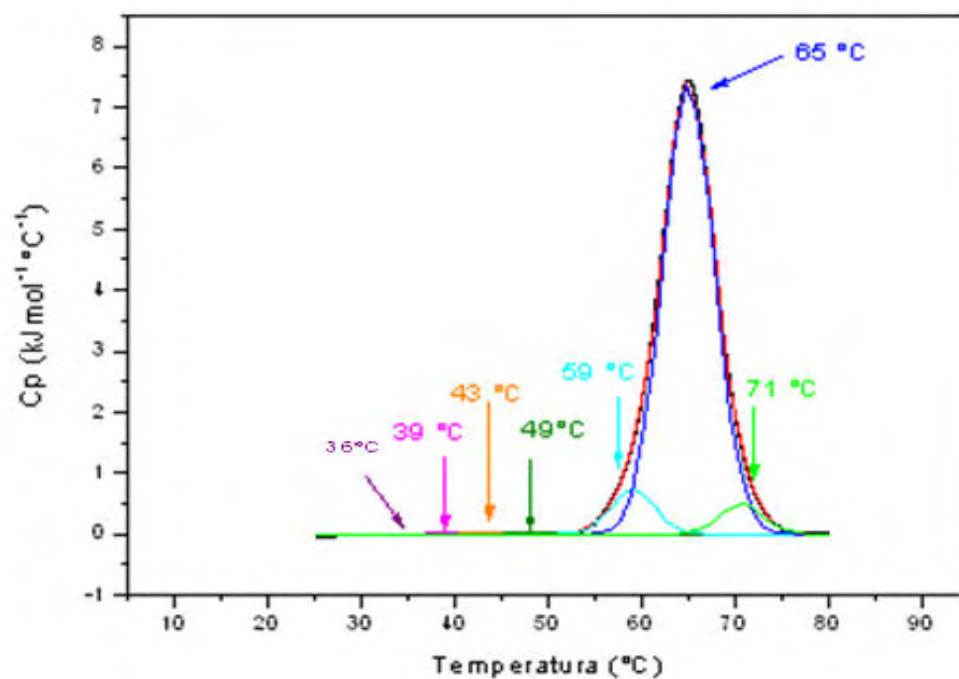


Figura 8 – Espectro de DSC deconvoluido de 26 á 78 $^\circ\text{C}$, identificando o ΔH_{cal} das sete regiões no qual o espectro foi analisado, onde a curva referente a soma das contribuições se sobrepõe a curva de DSC e as setas indicam o pico das gaussianas encontradas para cada temperatura.

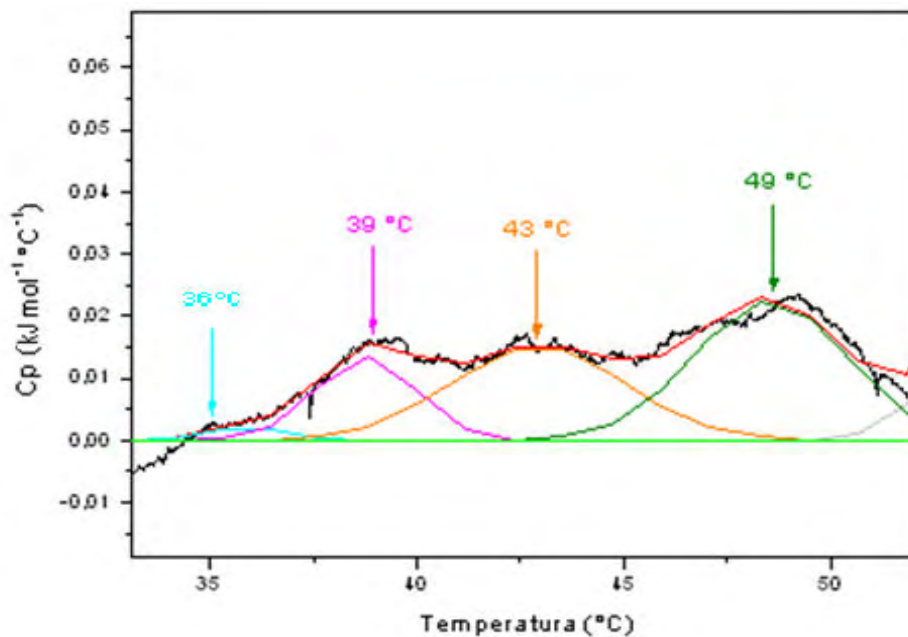


Figura 9 – Espectro de DSC deconvoluído ampliado de 33 á 52°C, identificando as quatro primeiras transições obtidas do termograma. A curva correspondente a soma das contribuições sobrepõe a curva de DSC (curva preta), com as respectivas gaussianas referentes as temperaturas de 36°C, 39°C, ~ 43°C e ~ 49°C.

Para demonstrar que a correção de linha de base não influenciou na identificação das quatro primeiras transições, realizamos uma ampliação das regiões correspondentes a essas temperaturas antes da correção de linha de base, mostrado na figura 10.

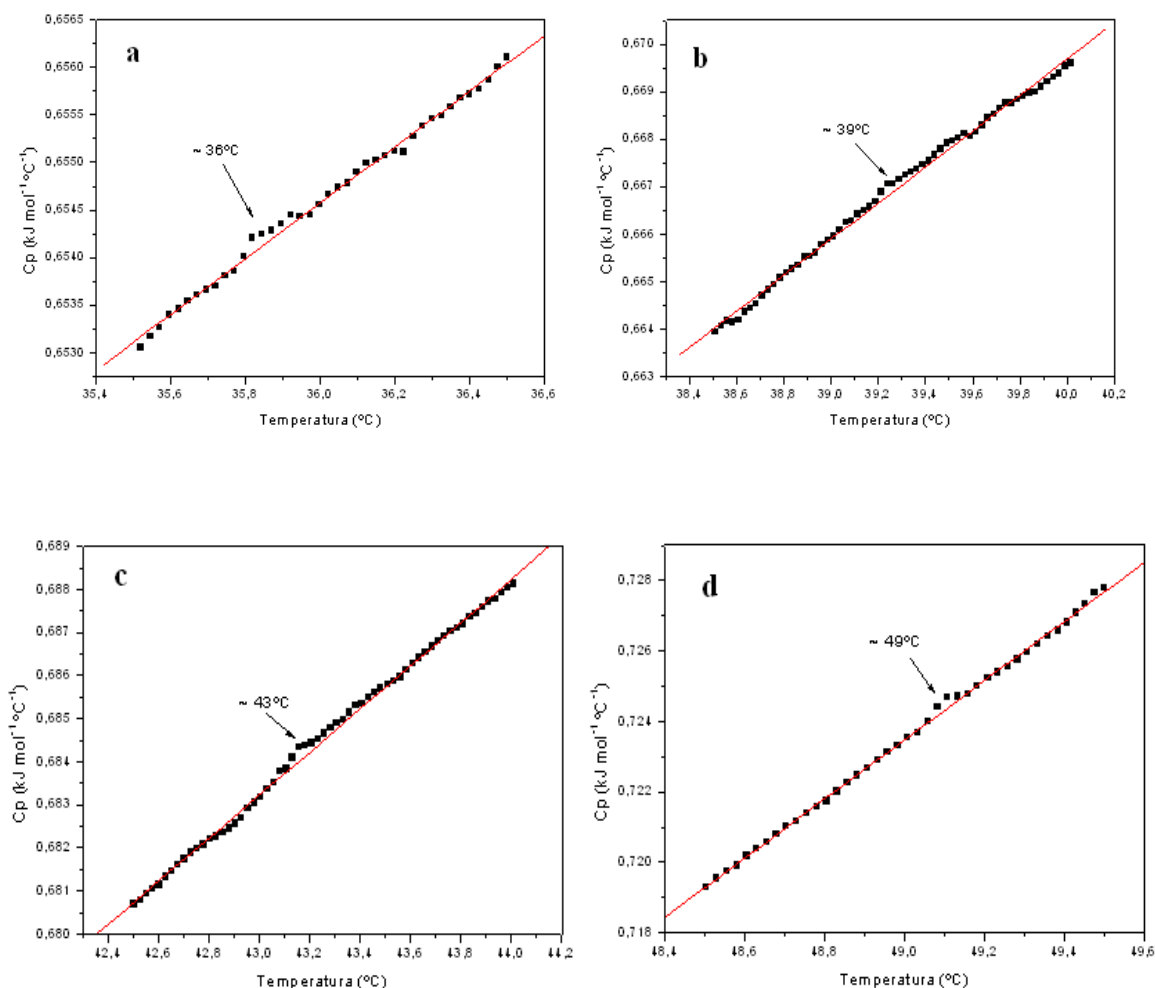


Figura 10 – Regiões do termograma da RNase A correspondentes as temperaturas de ~ 36 (a), ~ 39 (b), ~ 43 (c) e $\sim 49^\circ\text{C}$ (d), antes da correção de linha de base (linhas pontilhadas) e um *fit* para podermos visualizar melhor as transições (linha vermelha).

Podemos observar que essas transições, mesmo com pequena contribuição, estão presentes no termograma da RNase A, mesmo antes do *baseline*. Isso indica que são transições presentes no processo de desenovelamento térmico. A tabela 1 resume as temperaturas de transição (em Celsius ($^\circ\text{C}$)) obtidos pelo DSC, e suas respectivas variações de entalpia.

Tabela 1 – Resumo das temperaturas de transição encontrados no DSC, e suas respectivas áreas (ΔH) em kJ mol^{-1}

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_{cal} (kJ mol^{-1})
36 $^{\circ}\text{C}$	0,06 $\pm$ 0,01
~ 39 $^{\circ}\text{C}$	0,41 $\pm$ 0,1
~ 43 $^{\circ}\text{C}$	0,80 $\pm$ 0,2
~ 49 $^{\circ}\text{C}$	1,03 $\pm$ 0,1
~59 $^{\circ}\text{C}$	47,57 $\pm$ 0,5
65 $^{\circ}\text{C}$	502,64 $\pm$ 1
~71 $^{\circ}\text{C}$	34,00 $\pm$ 0,6

Com os dados da tabela 1, observamos que, a temperatura de transição principal (65 $^{\circ}\text{C}$) foi a que mais contribuiu energeticamente para o desenovelamento da RNase A, possuindo um $\Delta H_{\text{cal}} \sim 502 \text{ kJ mol}^{-1}$. Mais adiante quando apresentarmos os dados de SS-2D e VV-2D, realizaremos uma análise mais detalhada dos ΔH_{cal} .

6.2 – Desenovelamento térmico da RNase A

A região espectroscópica que utilizamos para o estudo de desenovelamento proteico foi a chamada região amida I, correspondente ao intervalo de 1700-1600 cm^{-1} . Essa região é atribuída principalmente a vibração de estiramento de C=O (BARTH, A, 2007). Os números de onda serão relacionados com determinadas estruturas secundárias, tomando como base o que já foi realizado em muitos trabalhos em espectroscopia de infravermelho nos últimos anos (BARTH, A., 2007; MURAYAMA, K. et al., 2004; YONG-BIN YAN, et al., 2006). A tabela 2 será utilizada para análise das estruturas secundárias, referentes a cada número de onda (cm^{-1}).

Tabela 2- Baseada nos dados experimentais de acordo com Yong-Bin Yan; Jun Zhang; Hua-Wei He; Hai-Meng Zhou, 2006.

Número de onda (cm⁻¹)	Estruturas secundárias
1611 – 1618	Cadeia Lateral/ agregação (altas temperaturas)
1625	Folhas- β
1629 – 1639	Folhas- β
1638	Folhas- β
1644 – 1649	Desordenadas (aleatória)
1650 – 1657	Hélice- α
1660 – 1675	Voltas
1682 – 1690	Folhas- β antiparalelas

A figura 11 mostra o resultado obtido do espectro FTIR da RNase A para o intervalo temperatura de 26 á 78 °C, com um $\Delta T = 2^\circ\text{C}$. É possível notar que alterações ocorrem no espectro da proteína. Percebe-se que para baixas temperaturas (abaixo de 60°C), existe a presença de pico marcante, por volta de 1640 cm⁻¹, correspondente as estruturas de folhas- β . Com o aumento da temperatura (acima de 60°C), a intensidade espectral em 1640 cm⁻¹ diminui, por possíveis rompimentos dessas estruturas secundárias, decorrentes a absorção de energia térmica.

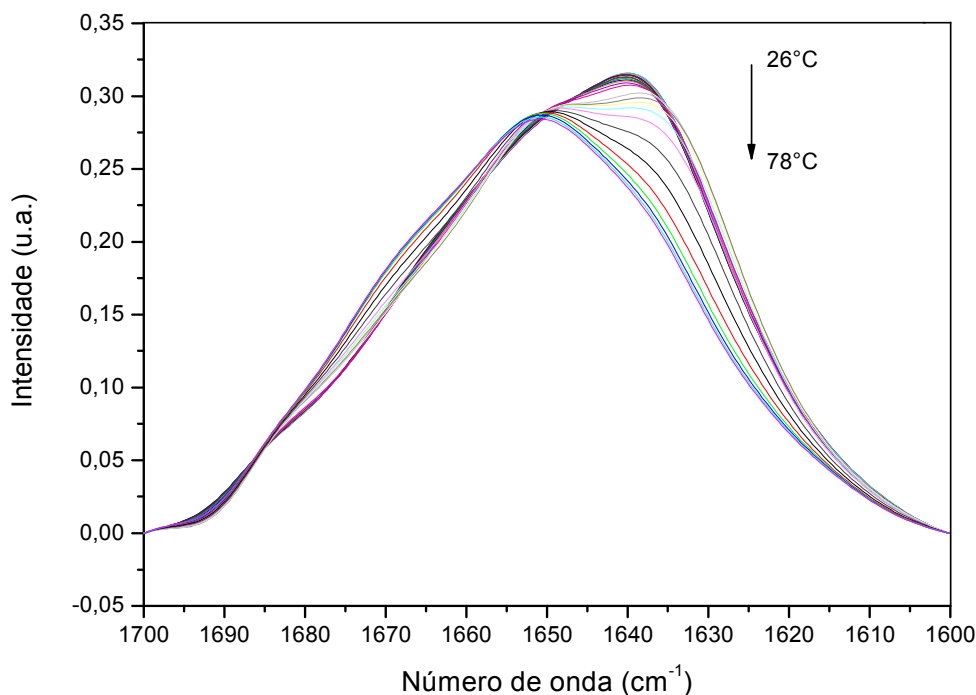


Figura 11 – Espectro de infravermelho da banda amida I, de 1600 – 1700 cm^{-1} , da proteína RNase A para temperaturas de 26°C a 78°C.

Informações sobre as mudanças nas estruturas secundárias são comprometidas no espectro 1D por causa da sobreposição de bandas referentes a cada componente. Para a obtenção de maiores detalhes sobre o processo de desenovelamento térmico da RNase A, utilizaremos as análise de correlação bidimensional *sample-sample* e variável-variável.

6.3- Análise de correlação *sample sample* (SS-2D)

A partir dos dados obtidos no FTIR e com o tratamento matricial realizado pela análise de correlação bidimensional *sample-sample* (SS - 2D), construímos a figura 12, que corresponde ao espectro de correlação SS-2D na forma de superfície (três dimensões) e o corte ortogonal do mesmo espectro de correlação SS - 2D para as temperatura de 26 á 78°C (figura 13). Na figura 12 temos um ponto

de sela indicado na superfície por uma seta. Este mesmo ponto é encontrado na figura 13 como um ponto de intersecção, indicado por uma seta. Ambos mostram a temperatura de transição principal ($\approx 65^{\circ}\text{C}$), que está em concordância com os estudos da RNase A (66°C) (LI-XU WANG, et al., 2006).

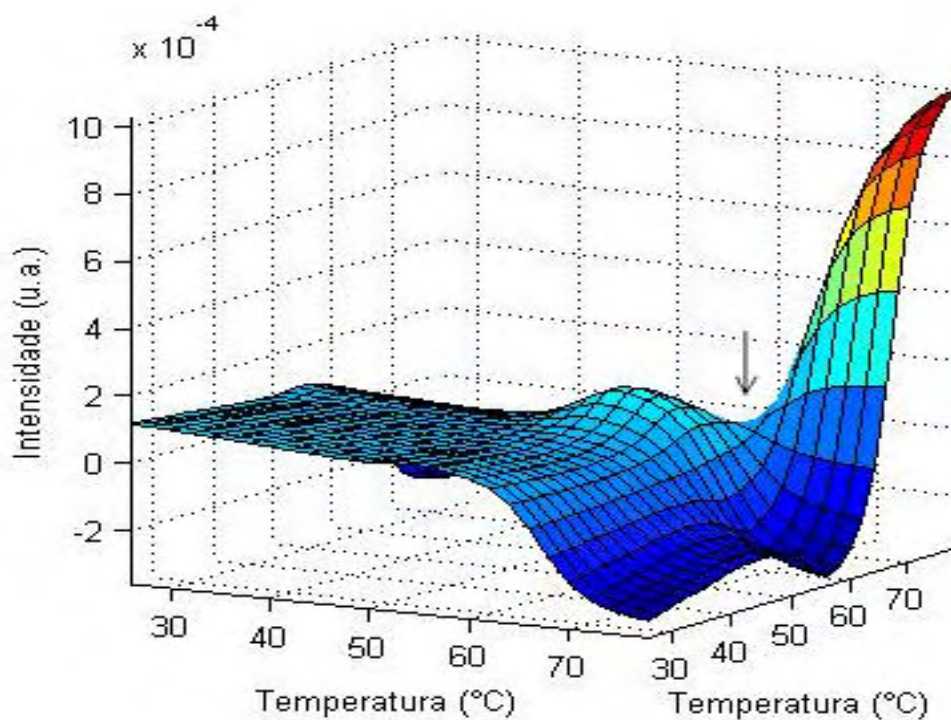


Figura 12 – Espectro de correlação sample-sample (SS-2D) para as temperaturas de 26 á 78 $^{\circ}\text{C}$, com um ponto de transição indicado pela flecha.

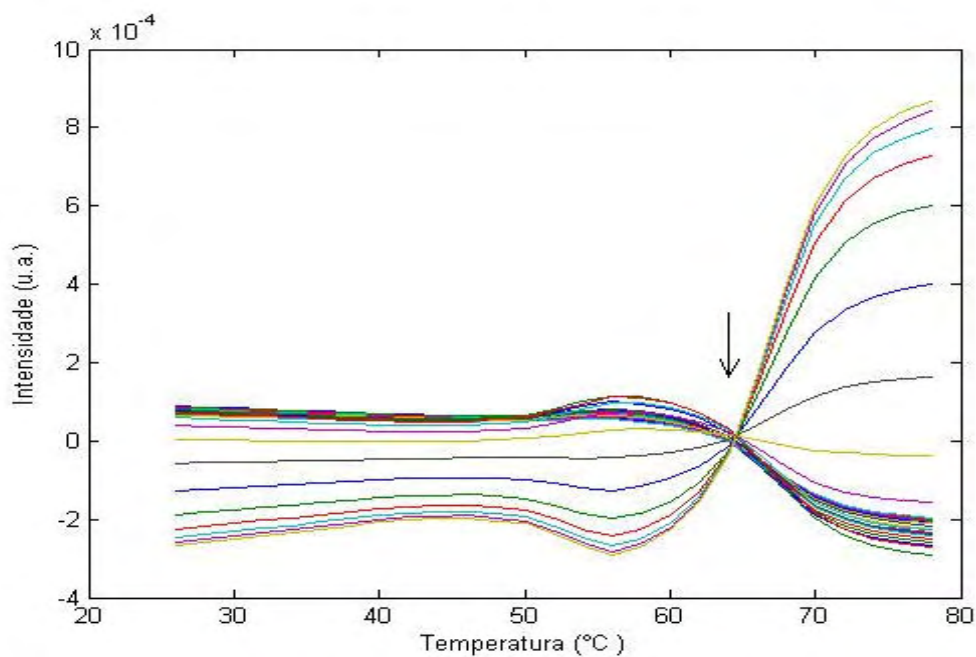


Figura 13 – Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 26 á 78°C, com um ponto de transição indicado pela flecha.

Ao obtermos essa temperatura, analisamos, então, a região abaixo (26°C a 64°C) e acima (66°C a 78°C) de 65°C, para identificarmos a presença de possíveis pré e pós-transições e suas respectivas temperaturas. Estas também são importantes no processo de desenovelamento da RNase A, pois nestas temperaturas a proteína passa por mudanças na sua conformação. Para a região abaixo de 65°C, temos a figura 14.

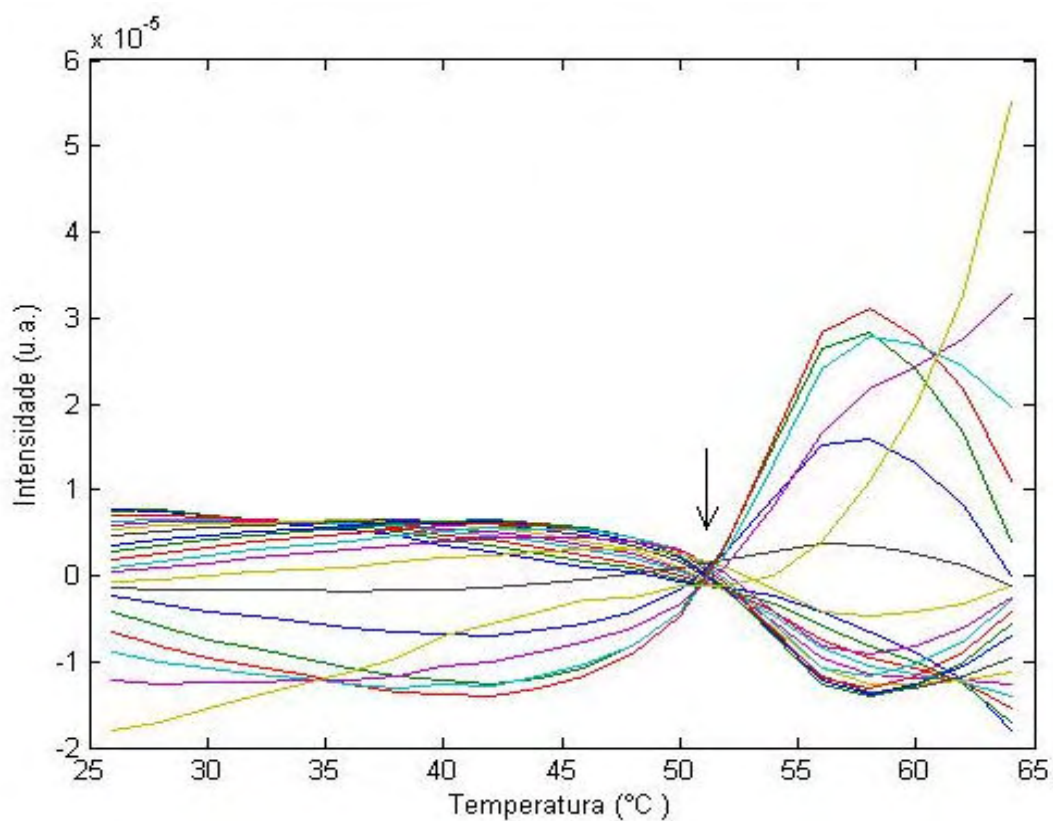


Figura 14 – Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 26 á 64°C.

A partir da análise da região abaixo da temperatura de transição principal, identificamos um ponto de transição em $\sim 51^{\circ}\text{C}$ (figura 12). Com isso, analisamos, novamente, a região abaixo a essa temperatura (26 á 50°C) e identificamos mais três transições.

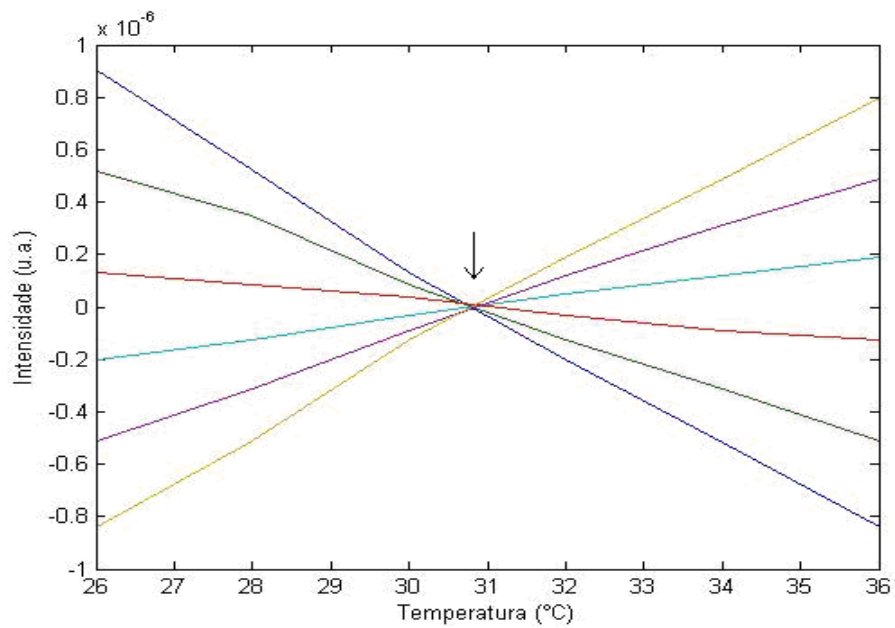


Figura 15 – Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 26 á 36°C.

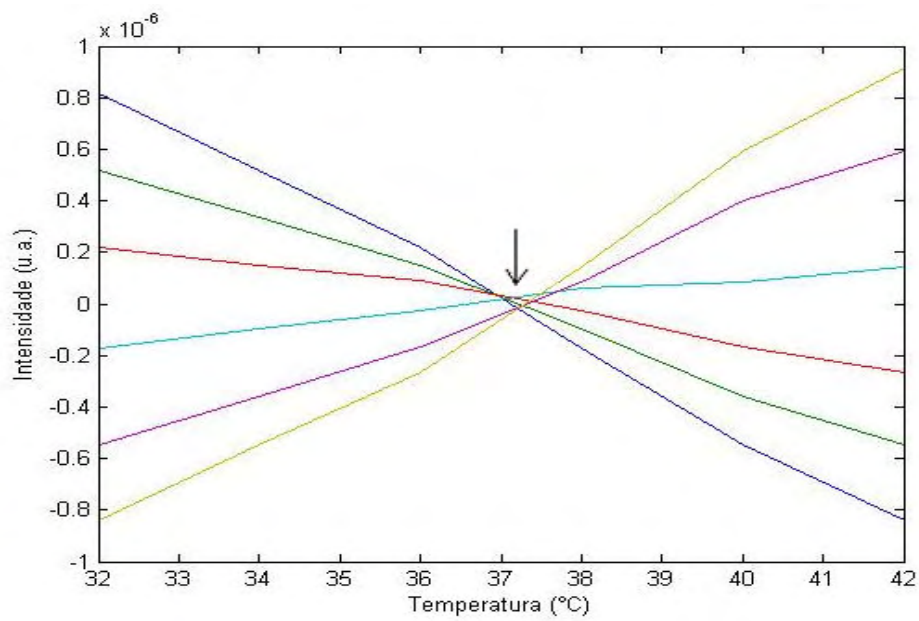


Figura 16 – Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 32 á 42°C.

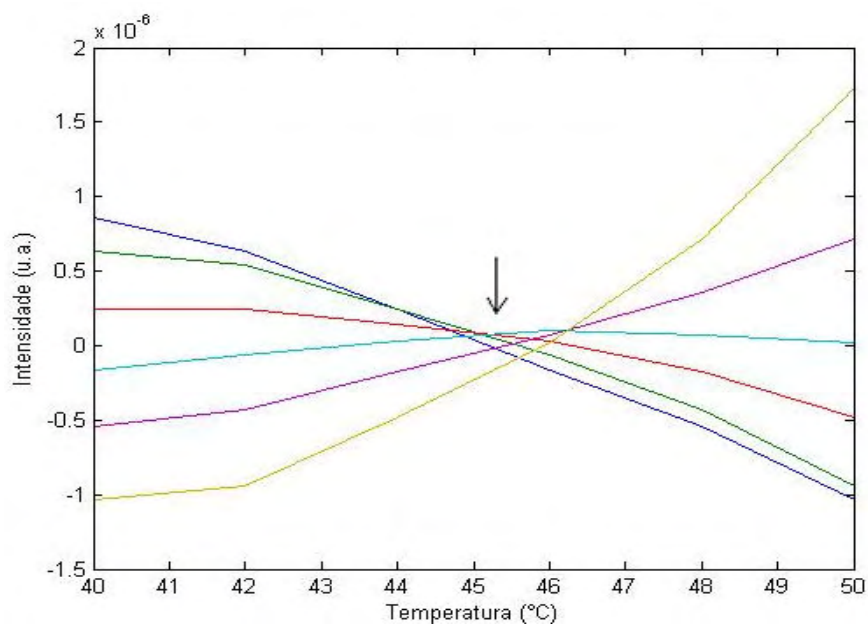


Figura 17 - Corte ortogonal SS - 2D para a RNase A para as temperaturas de 40 a 50°C.

Identificamos, a partir das figuras 15, 16 e 17, mais três pontos de transição (31, 37 e ~ 45°C). Isso nos mostra que a região abaixo de 65°C possui temperaturas de pré transições no processo de desenovelamento. Realizamos também a análise da região acima da temperatura de transição principal, identificando a existência de um ponto de transição (pós – transição), como mostra a figura 18.

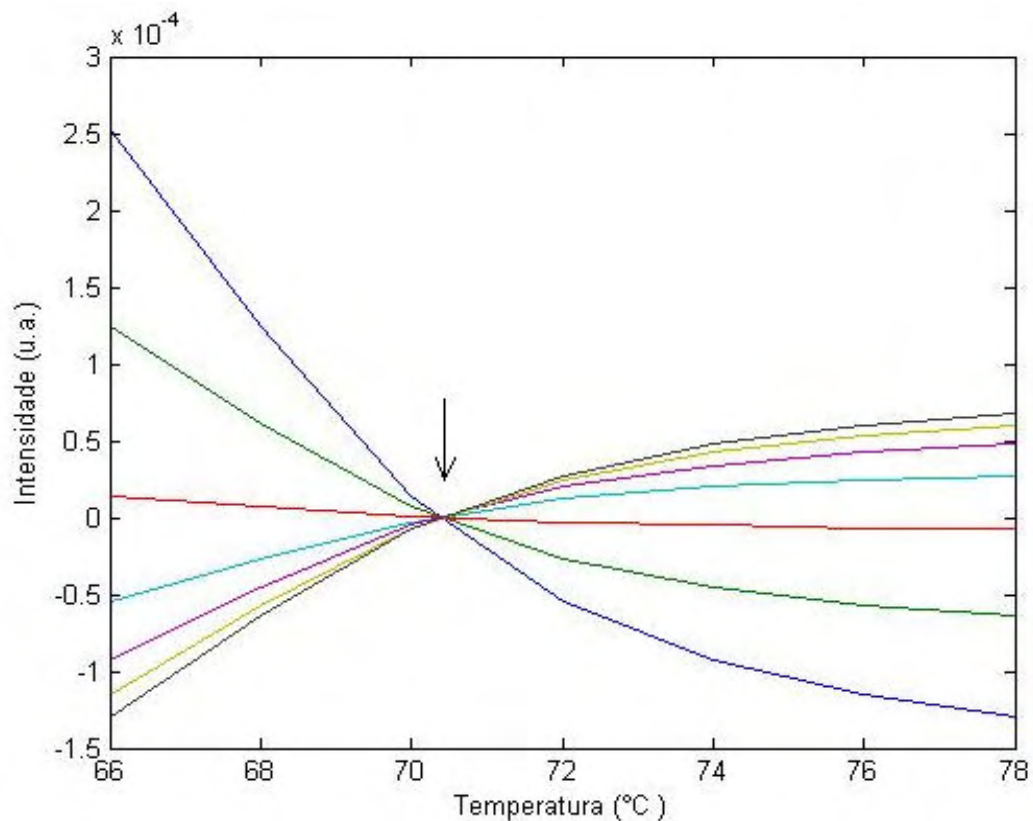


Figura 18 – Corte ortogonal do SS - 2D da RNase A para as temperaturas de 66 á 78°C.

Com isso, identificamos quatro temperaturas de pré-transição (31, 37, 45 e 51°C) e uma temperatura de pós-transição em ~ 70°C. Assim é possível construirmos a tabela 3 que resume as temperaturas de transições obtidas no DSC e na análise de correlação SS-2D.

Tabela 3 – Resumo das temperaturas de transição encontrados no SS – 2D e DSC.

	SS – 2D	DSC
1ª região	31°C	36°C
2ª região	~ 37°C	~ 39°C
3ª região	~ 45°C	~ 43°C
4ª região	~ 51°C	~49°C
5ª região (melting)	65°C	59 e 65°C
6ª região	~ 70°C	~71°C

A partir dos dados da tabela 3, observamos a corroboração da correlação SS-2D pelos dados de DSC, identificando, praticamente, as mesmas temperaturas de transições, nas mesmas regiões estudadas. Com isso temos que ambas as técnicas são capazes de identificar essas transições. Isso é importante pois possibilita a confirmação da existência de múltiplas transições, que são cruciais para a compreensão do processo de desenovelamento da RNase A.

6.4- Análise de correlação variável variável (VV-2D)

Investigaremos, conformacionalmente, as regiões das transições, que foram identificadas por DSC e correlação SS-2D. A seguir apresentaremos a análise de correlação VV – 2D de cada região específica, contendo a temperatura de transição, para identificarmos as mudanças conformacionais ocorridas em cada região.

6.4.1 - Primeira região:

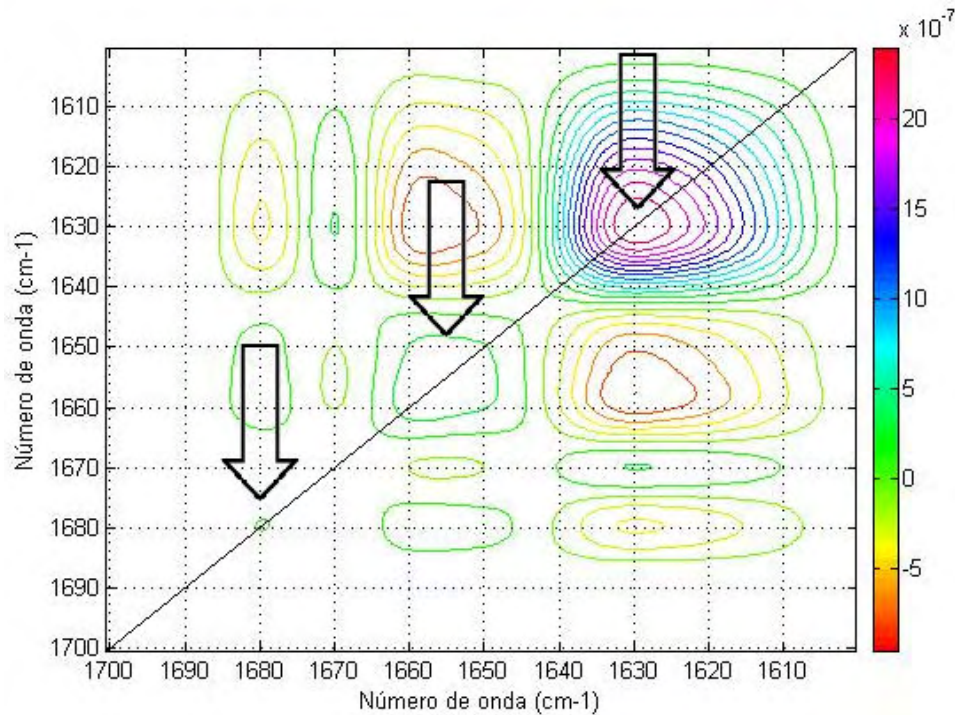


Figura 19 – VV - 2D síncrono para a primeira região.

A partir do gráfico síncrono (figura 19) identificamos os auto picos (presentes na diagonal, indicados com flechas) em 1630 cm^{-1} , que corresponde às estruturas de folhas- β , em 1656 cm^{-1} e 1680 cm^{-1} , correspondentes as hélices- α e folhas- β antiparalelas, respectivamente. Nos picos cruzados (fora da diagonal), identificamos a correlação entre essas estruturas, sugerindo que as mudanças de intensidade espectrais ocorrem em direções coincidentes (pico cruzado positivo) ou opostas (picos cruzados negativos).

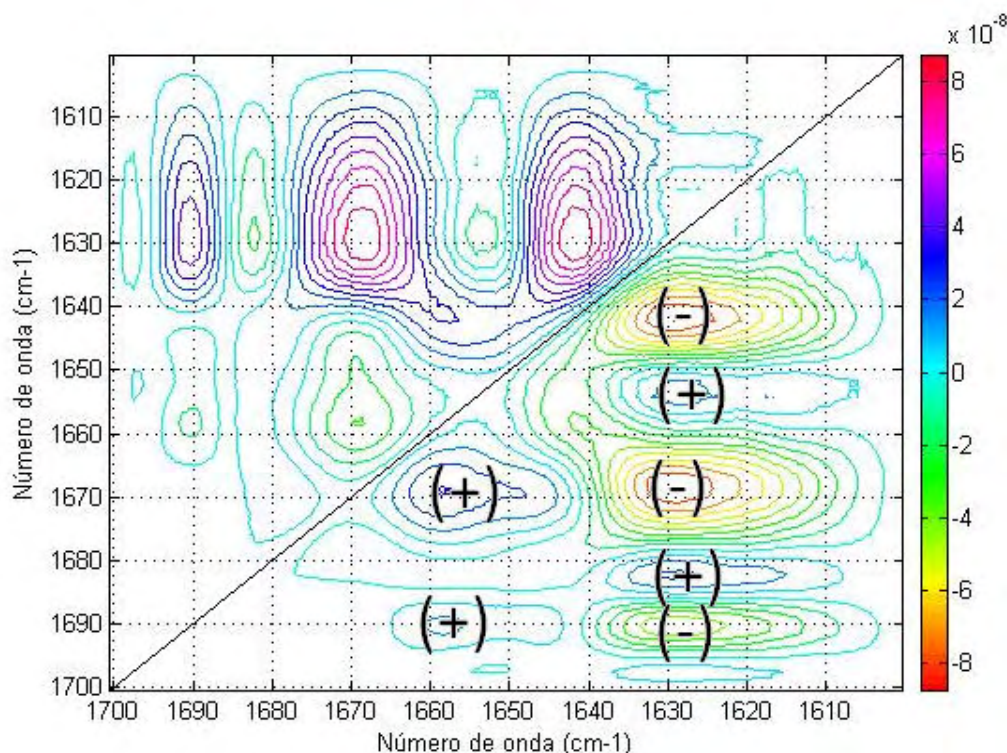


Figura 20 – VV - 2D assíncrono para a primeira região.

Com o gráfico do VV - 2D assíncrono (figura 20), é possível evidenciar as correlações entre as estruturas, isso é, podemos identificar a ordem com que as estruturas se modificam, ou seja, a sequência de eventos para a primeira região. Os picos cruzados positivos são: (1629 - 1682 cm^{-1}), (1629 - 1656 cm^{-1}), (1656 - 1690 cm^{-1}) e (1656 - 1669 cm^{-1}), indicando que as estruturas de folhas- β assinaladas em 1629 cm^{-1} são posteriormente afetadas que as hélice- α (1656 cm^{-1}) e folhas- β antiparalelas (1682 cm^{-1}). Isso sugere que as estruturas secundárias de hélices- α e folhas- β antiparalelas são mais suscetíveis termicamente, quando comparadas as folhas- β . Temos também uma correlação entre hélice- α em 1656 cm^{-1} e, folhas- β antiparalelas (1690 cm^{-1}) e voltas- β (1669 cm^{-1}), indicando que as a voltas- β e folhas- β antiparalelas são posteriormente afetadas que as hélices- α . Essa correlação sugere que as estruturas secundárias de hélices- α são termicamente mais suscetíveis do que as voltas- β e folhas- β antiparalelas. Os picos negativos são: (1629

- 1690 cm^{-1}), ($1629 - 1668\text{ cm}^{-1}$) e ($1629 - 1642\text{ cm}^{-1}$), indicando que as folhas- β em 1629 cm^{-1} são posteriormente afetadas que folhas- β antiparalelas em 1690 cm^{-1} , as voltas- β em 1668 cm^{-1} e folhas- β em 1642 cm^{-1} . Isso sugere que as estruturas secundárias de folhas- β antiparalelas, voltas- β e folhas- β em 1642 cm^{-1} são mais suscetíveis termicamente, quando comparadas as folhas- β em 1629 cm^{-1} .

Com isso temos a seguinte sequência de suscetibilidade térmica das estruturas secundárias: hélices- α > folhas- β antiparalelas, voltas- β e folhas- β em 1642 cm^{-1} > folhas- β em 1629 cm^{-1} . Portanto identificamos para a primeira região, que as hélices- α em 1656 cm^{-1} são as estruturas secundárias mais suscetíveis a flutuações térmicas na RNase A.

6.4.2 - Segunda região:

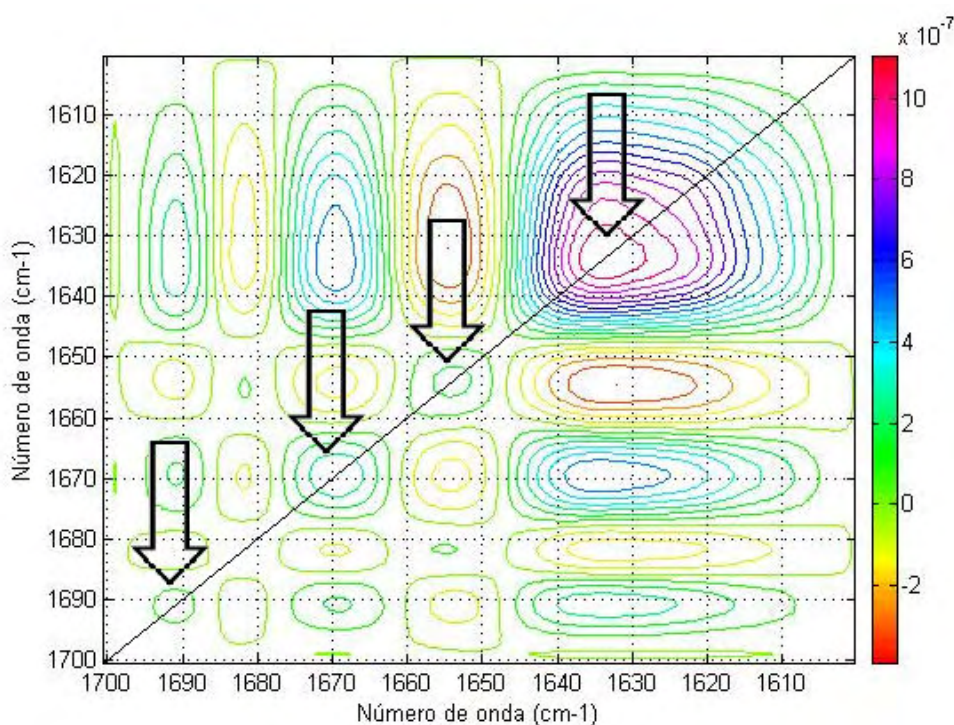


Figura 21 – VV - 2D síncrono para a segunda região.

Analisando o gráfico síncrono (figura 21) notamos, nos auto picos (flechas maiores), a presença de folhas- β em 1632 cm^{-1} , hélice- α em 1655 cm^{-1} , voltas- β em 1670 cm^{-1} e folhas- β antiparalela em 1691 cm^{-1} . Nos picos cruzados

(fora da diagonal), identificamos a correlação entre essas estruturas secundárias, sugerindo tanto mudanças de intensidades coincidentes (picos cruzados positivos), como mudanças de intensidades opostas (picos cruzados negativos).

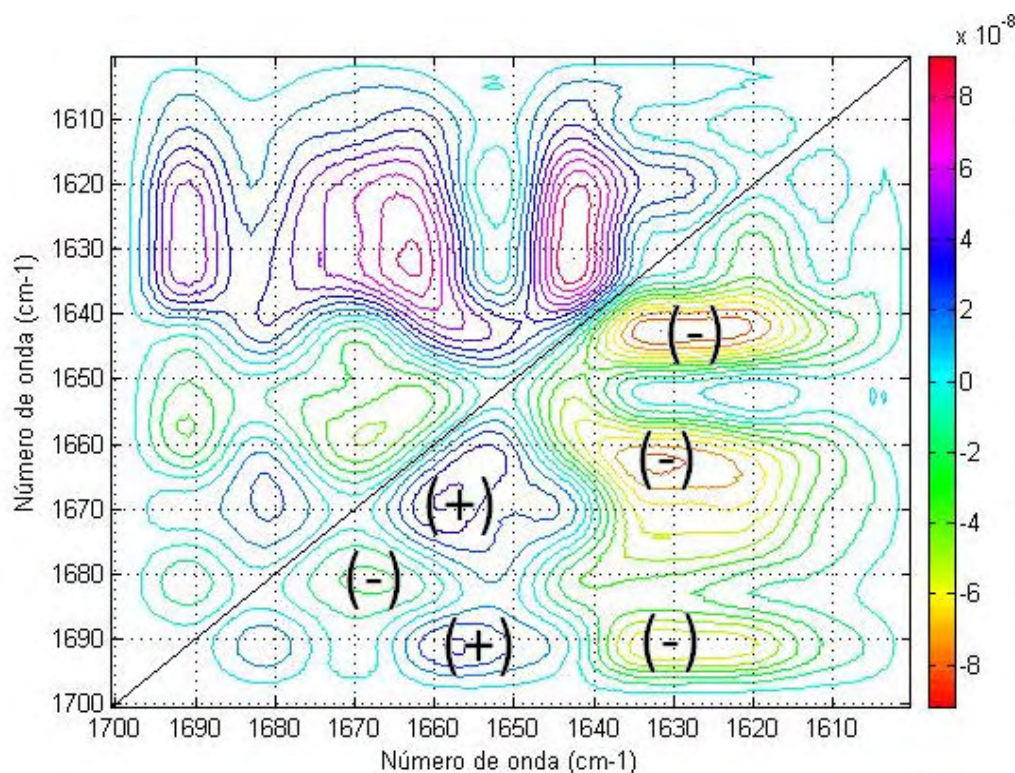


Figura 22 – VV - 2D assíncrono para a segunda região.

No gráfico assíncrono (figura 22), é possível evidenciar as correlações entre as estruturas. Os picos cruzados positivos são: (1656 - 1691 cm^{-1}) e (1656 - 1668 cm^{-1}), indicando que as hélices- α são posteriormente afetadas do que as folhas- β antiparalelas em 1691 cm^{-1} e voltas- β em 1668 cm^{-1} . Isso sugere que as estruturas secundárias de folhas- β antiparalelas e voltas- β são mais suscetíveis a flutuações térmicas do que as hélices- α . Os picos negativos são: (1629 - 1691 cm^{-1}), (1632 - 1663 cm^{-1}), (1632 - 1642 cm^{-1}) e (1669-1681 cm^{-1}), indicando que as folhas- β em 1632 cm^{-1} são posteriormente afetadas que as voltas- β e folhas- β em 1642 cm^{-1} . O mesmo se aplica as folhas- β em 1629 cm^{-1} , quando correlacionadas com as folhas- β antiparalelas em 1691 cm^{-1} . Essa informação sugere que e as estruturas

secundárias de voltas- β e folhas- β em 1642 cm^{-1} são mais suscetíveis termicamente, quando comparadas as folhas- β em 1632 cm^{-1} . As folhas- β antiparalelas também são termicamente mais suscetíveis do que folhas- β em 1629 cm^{-1} . Temos também a correlação ($1669\text{-}1681\text{ cm}^{-1}$), indicando que as estruturas de folhas- β antiparalelas em 1681 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que as voltas- β em 1669 cm^{-1} . Essa informação sugere que as estruturas secundárias de voltas- β são mais suscetíveis termicamente, quando comparadas as folhas- β antiparalelas.

A partir dessas informações, obtivemos a seguinte sequência de suscetibilidade térmica para as estruturas secundárias: Voltas- β > folhas- β antiparalelas e folhas- β em 1642 cm^{-1} > folhas- β em 1632 e 1629 cm^{-1} e hélices- α . Portanto temos para a segunda região, que as estruturas secundárias mais suscetíveis a flutuações térmicas são as voltas- β .

6.4.3 - Terceira região:

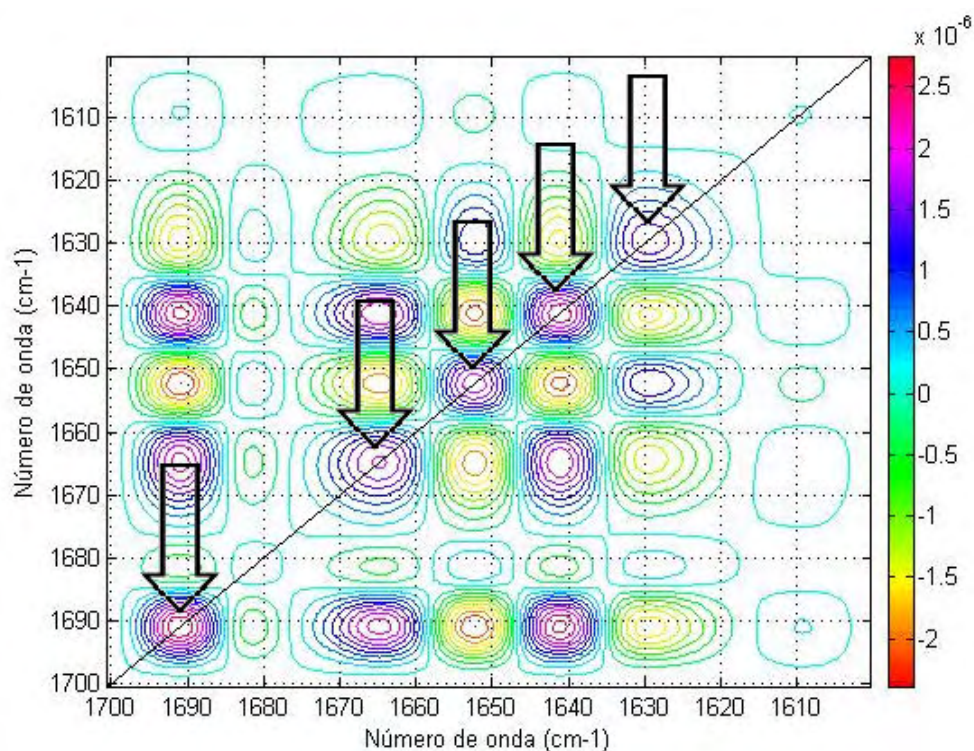


Figura 23 – VV - 2D síncrono para a terceira região.

Analisando o gráfico síncrono (figura 23) identificamos, nos auto picos (flechas), a presença de picos em 1630 cm^{-1} , correspondente as folhas- β , folhas- β em 1642 cm^{-1} , hélices- α em 1653 cm^{-1} , voltas- β em 1665 cm^{-1} e folhas- β antiparalelas em 1692 cm^{-1} . Os picos cruzados positivos e negativos (fora da diagonal) mostram a correlação entre essas estruturas, indicando a coincidência ou não das mudanças de intensidade.

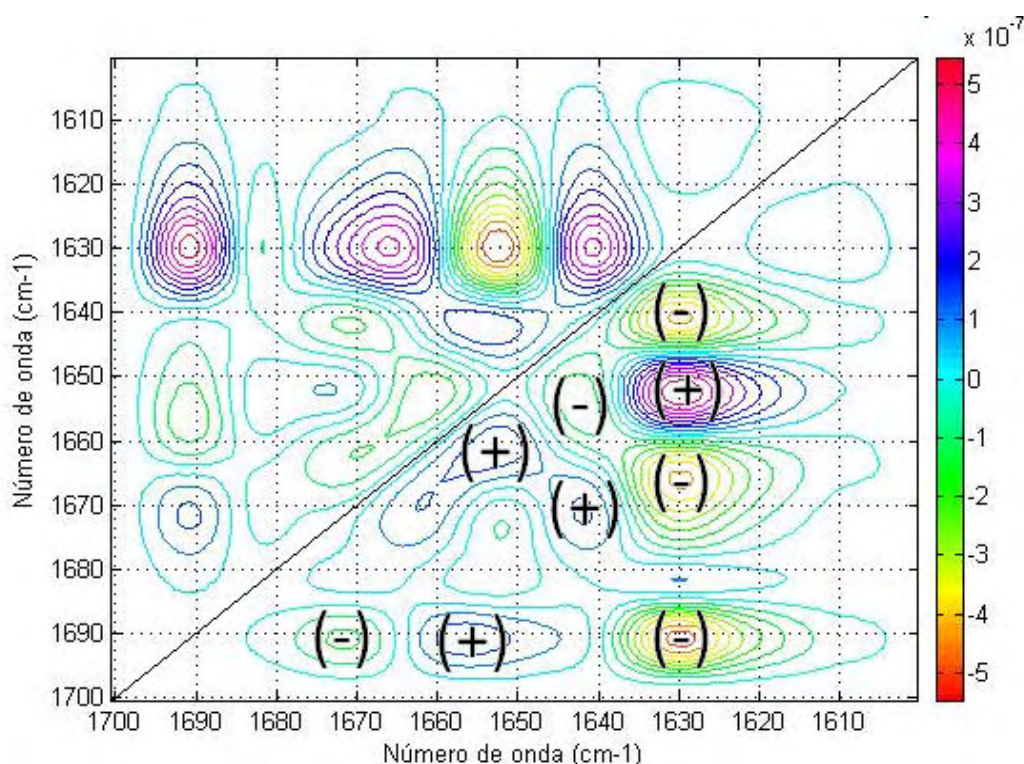


Figura 24 – VV - 2D assíncrono para a terceira região.

No gráfico assíncrono (figura 24), é possível observar as correlações entre as estruturas. Os picos cruzados positivos são: (1630 - 1653 cm^{-1}), (1642 - 1671 cm^{-1}), (1653 - 1691 cm^{-1}) e (1653 - 1663 cm^{-1}), indicando que as estruturas de hélices- α assinaladas em 1653 cm^{-1} são posteriormente afetadas, com relação as folhas- β antiparalelas em 1691 cm^{-1} e voltas- β em 1663 cm^{-1} . Isso sugere que as estruturas secundárias de folhas- β antiparalelas e voltas- β são mais suscetíveis a flutuações térmicas, quando comparadas com as hélices- α . As voltas- β em 1670 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que folhas- β em 1641 cm^{-1} , sugerindo que as estruturas secundárias de folhas- β em 1641 cm^{-1} são mais suscetíveis termicamente do que as voltas- β . O mesmo acontece com as folhas- β em 1630 cm^{-1} quando comparadas com as hélices- α (1653 cm^{-1}) tendo que as folhas- β são mais suscetíveis termicamente que as hélices- α .

Os picos cruzados negativos são: (1630 - 1691 cm^{-1}), (1630 - 1665 cm^{-1}), (1630 - 1642 cm^{-1}), (1642 - 1653 cm^{-1}) e (1671 - 1691 cm^{-1}), indicando que as folhas- β antiparalelas em 1691 cm^{-1} , voltas- β em 1665 cm^{-1} e folhas- β em 1642 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que as folhas- β em 1630 cm^{-1} . Isso sugere que as estruturas secundárias de folhas- β em 1630 cm^{-1} são termicamente mais suscetíveis, quando comparadas com as folhas- β antiparalelas, voltas- β e folhas- β em 1642 cm^{-1} . As hélices- α em 1653 cm^{-1} são posteriormente afetadas com relação as folhas- β em 1642 cm^{-1} , sugerindo que as estruturas secundárias de folhas- β em 1642 cm^{-1} são mais suscetíveis termicamente do que as hélices- α . O mesmo acontece com as estruturas secundárias de folhas- β antiparalelas quando comparadas com as voltas- β , tendo que as folhas- β antiparalelas são termicamente mais suscetíveis que as voltas- β .

A partir da análise VV-2D, temos a seguinte sequência de eventos para as estruturas secundárias: folhas- β em 1630 cm^{-1} > folhas- β em 1642 cm^{-1} > hélices- α > folhas- β antiparalelas > voltas- β . Portanto temos que as estruturas de folhas- β em 1630 cm^{-1} são as mais suscetíveis a flutuações térmicas nessa região.

6.4.4 - Quarta região:

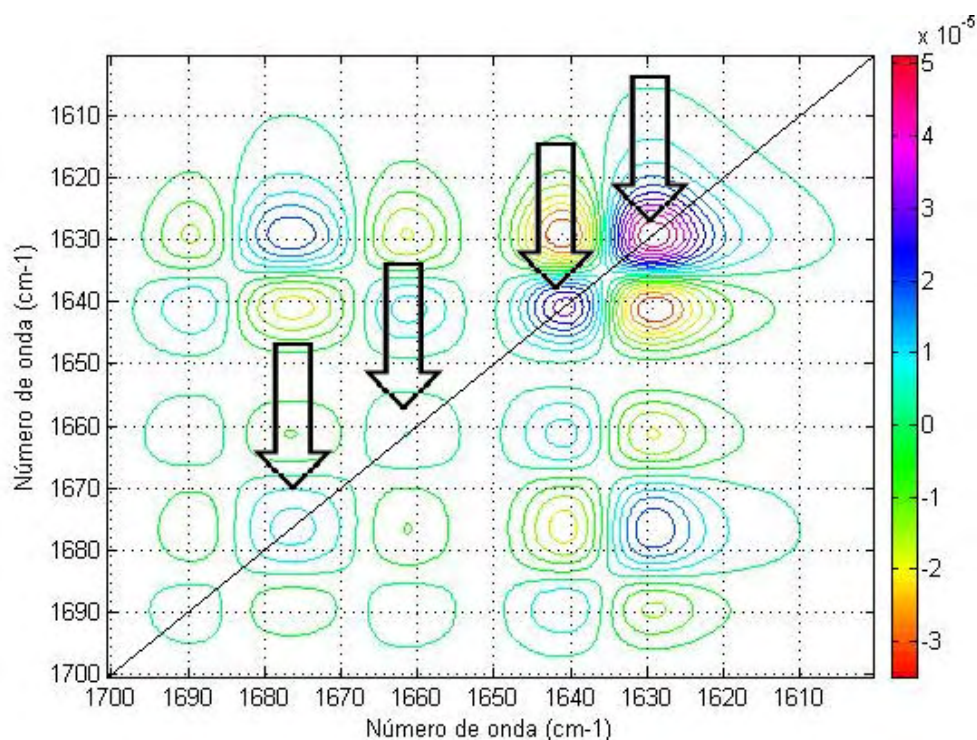


Figura 25 – VV - 2D síncrono para a quarta região.

Considerando o gráfico síncrono (figura 25) notamos, nos auto picos (flechas), a presença de picos em 1630 cm^{-1} e 1641 cm^{-1} , ambos referentes as folhas- β e também em 1662 e 1675 cm^{-1} , correspondentes a estrutura de voltas- β . Os picos cruzados (fora da diagonal) indicam a correlação entre essas estruturas, nos quais as mudanças de intensidade podem ser coincidentes (picos cruzados positivos) ou opostas (picos cruzados negativos).

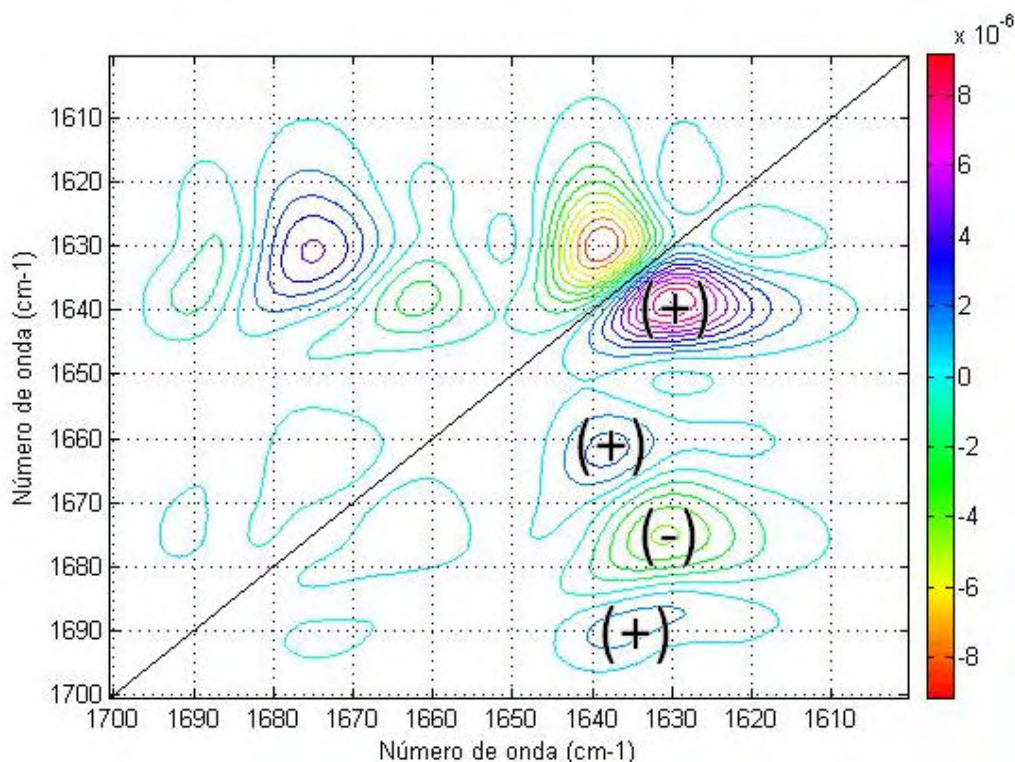


Figura 26 – VV - 2D assíncrono para a quarta região.

No gráfico assíncrono (figura 26), é possível identificar as correlações entre as estruturas. Os picos cruzados positivos são: (1630 – 1640 cm^{-1}), (1635 – 1690 cm^{-1}) e (1638 – 1662 cm^{-1}), indicando que as estruturas de folhas- β em 1630 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que as folhas- β em 1640 cm^{-1} . Isso sugere que as estruturas secundárias de folhas- β em 1640 cm^{-1} são mais suscetíveis a flutuações térmicas do que as folhas- β em 1630 cm^{-1} . As folhas- β em 1635 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que as folhas- β antiparalelas em 1690 cm^{-1} , sugerindo que as estruturas secundárias de folhas- β antiparalelas são termicamente mais suscetíveis, quando comparadas com as folhas- β em 1635 cm^{-1} . As voltas- β em 1662 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que as folhas- β em 1638 cm^{-1} , sugerindo que as estruturas secundárias de folhas- β em 1638 cm^{-1} são mais suscetíveis termicamente do que as voltas- β .

O pico negativo se localiza em: $(1631 - 1675 \text{ cm}^{-1})$, indicando que as folhas- β em 1631 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que as voltas- β em 1675 cm^{-1} . Isso sugere que as estruturas secundárias de voltas- β são termicamente mais suscetíveis do que as folhas- β em 1631 cm^{-1} .

A partir das informações acima, temos a seguinte sequência de eventos para as estruturas secundárias: folhas- β em 1638 e 1640 cm^{-1} > voltas- β e folhas- β antiparalelas > folhas- β em 1630 e 1635 cm^{-1} . Com isso temos que as estruturas secundárias de folhas- β em 1640 e 1638 cm^{-1} são as mais suscetíveis a flutuações térmicas referentes à quarta região.

6.4.5 - Quinta região:

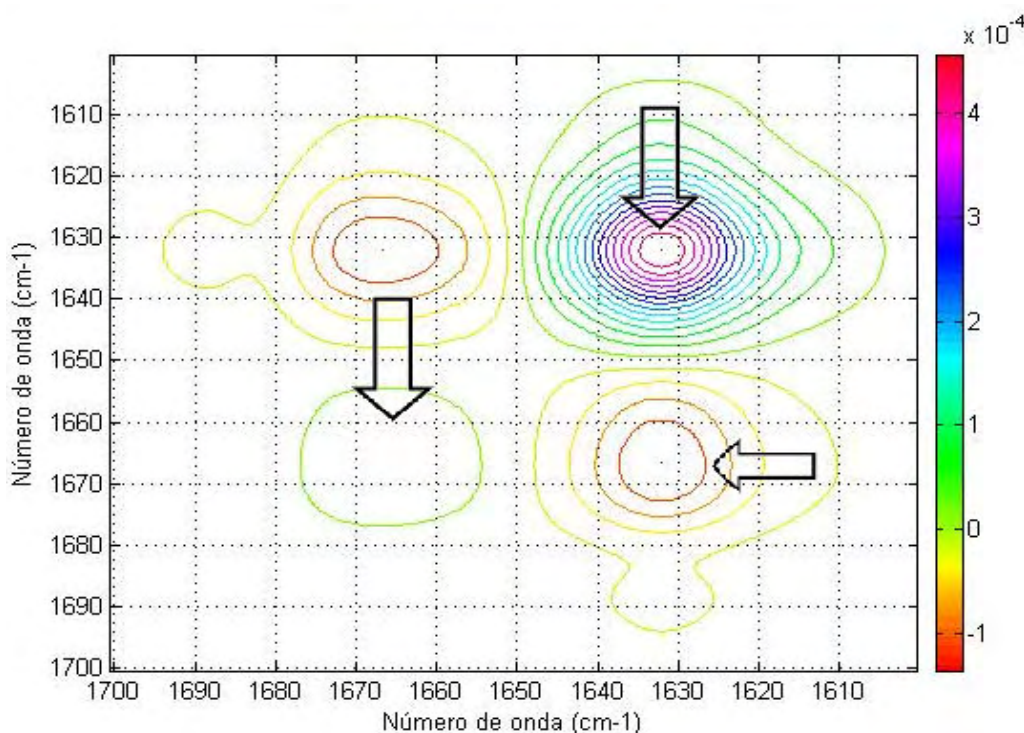


Figura 27 – VV - 2D síncrono para a quinta região.

Analisando o mapa síncrono (figura 27) notamos, nos auto picos (flechas maiores), a presença de folhas- β em 1632 cm^{-1} e de voltas- β em 1665 cm^{-1} . No pico cruzado negativo (flecha menor), identificamos a correlação entre as estruturas secundárias de folhas- β em 1632 cm^{-1} e voltas- β em 1665 cm^{-1} , indicando

que as mudanças de intensidade são em direções opostas, ou seja, enquanto as folhas- β diminuem, as estruturas de voltas- β aumentam.

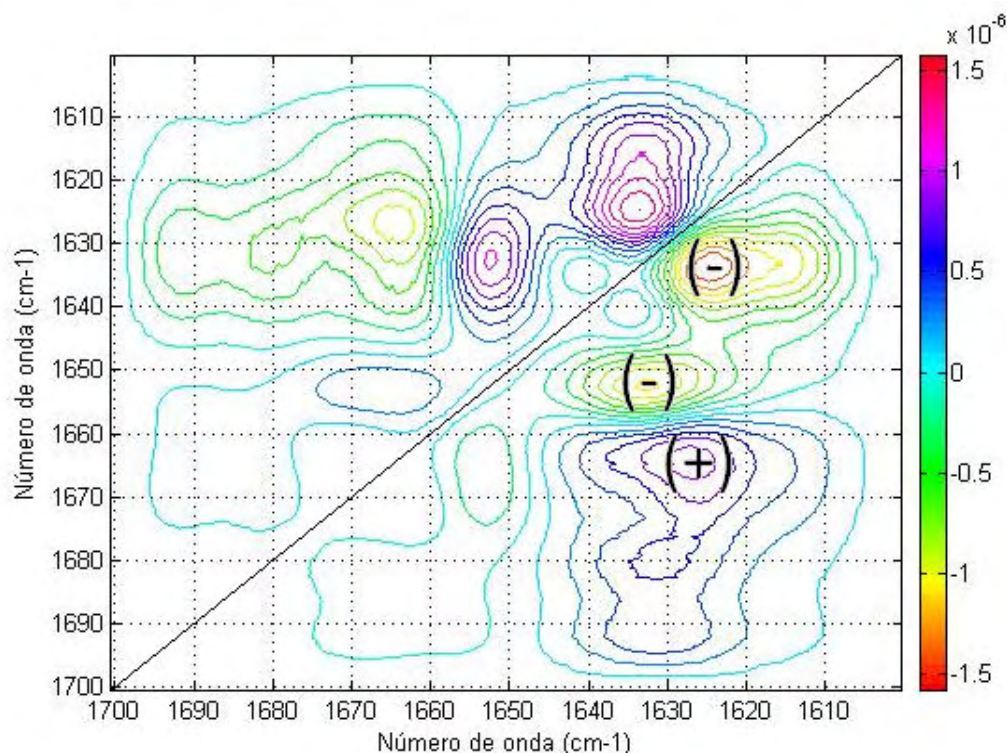


Figura 28 – VV - 2D assíncrono para a quinta região.

No gráfico assíncrono (figura 28), é possível evidenciar as correlações entre as estruturas secundárias. O pico cruzado positivo se localiza em: (1627 – 1665 cm^{-1}), indicando que as estruturas de folhas- β em 1627 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que as voltas- β em 1665 cm^{-1} . Isso sugere que as estruturas secundárias de voltas- β são mais suscetíveis termicamente, quando comparadas com as folhas- β em 1627 cm^{-1} . Os picos cruzados negativos são: (1627 - 1632 cm^{-1}) e (1632 - 1653 cm^{-1}), indicando que as folhas- β em 1632 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que as hélices- α em 1653 cm^{-1} . Isso sugere que as estruturas secundárias de hélices- α são termicamente mais suscetíveis do que as folhas- β em 1632 cm^{-1} . O mesmo acontece com as estruturas secundárias de folhas- β

em 1632 cm^{-1} quando comparadas com as folhas- β em 1627 cm^{-1} , tendo que as folhas- β em 1632 cm^{-1} são mais suscetíveis termicamente do que as folhas- β em 1627 cm^{-1} .

Com os dados da correlação VV-2D mostrados acima, temos a seguinte sequência de eventos para as estruturas secundárias: hélices- α > folhas- β em 1632 cm^{-1} e voltas- β > folhas- β em 1627 cm^{-1} . Portanto temos que as estruturas secundárias mais suscetíveis a mudanças conformacionais na quinta região são as hélices- α em 1653 cm^{-1} .

6.4.6 - Sexta região:

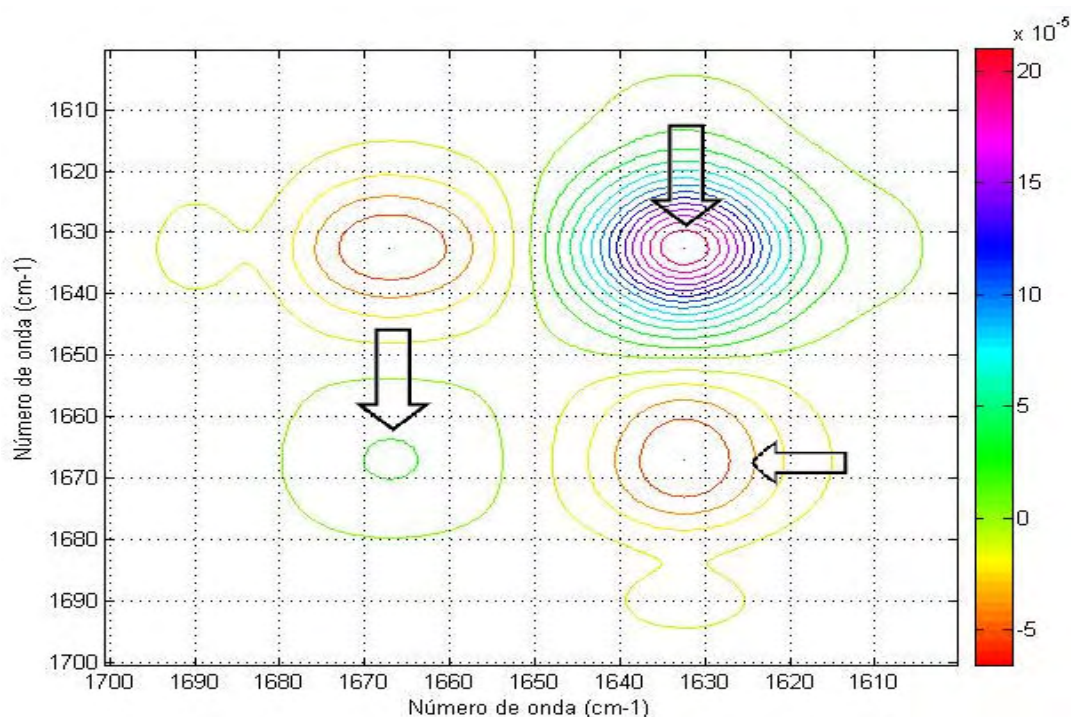


Figura 29 – VV - 2D síncrono para a sexta região.

Analisando o mapa síncrono (figura 29) notamos, nos auto picos (flechas maiores), a presença de picos em 1632 cm^{-1} e 1667 cm^{-1} , correspondente as estruturas de folhas- β e voltas- β , respectivamente. No pico cruzado negativo (flecha menor), identificamos a correlação entre as estruturas de folhas- β e voltas- β , indicando que as folhas- β diminuem, enquanto as estruturas de voltas- β aumentam.

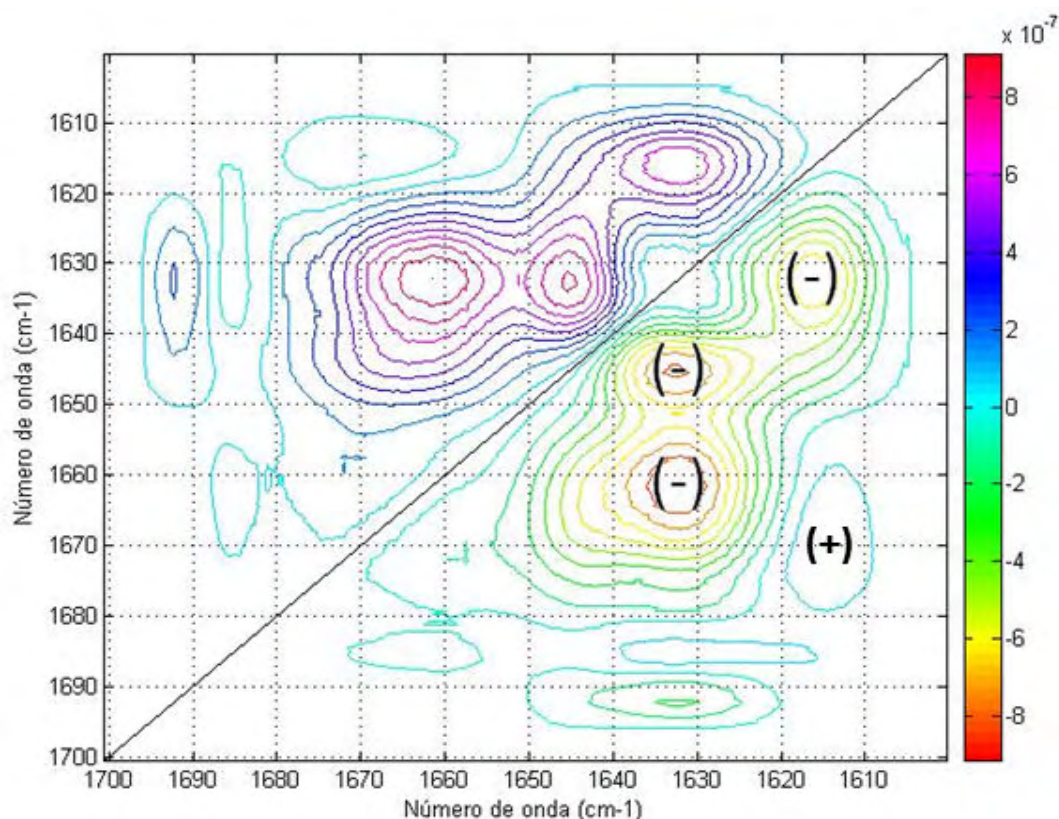


Figura 30 – VV - 2D assíncrono para a sexta região.

No gráfico assíncrono (figura 30), é possível evidenciar as correlações entre as estruturas. O pico cruzado positivo é: (1616 - 1670 cm^{-1}), indicando que as estruturas de voltas- β são posteriormente afetadas do que a formação de agregados. Isso sugere a formação de agregados quando comparados com as estruturas de voltas- β . Os picos cruzados negativos são: (1616 - 1632 cm^{-1}), (1632 - 1662 cm^{-1}) e (1632 - 1645 cm^{-1}), indicando que a formação de agregados (LI-XU WANG, et al. 2008 e LI-XU WANG, et al. 2006), e as estruturas secundárias de voltas- β em 1662 cm^{-1} são posteriormente afetadas do que as folhas- β em 1632 cm^{-1} . Isso sugere que as estruturas secundárias de folhas- β em 1632 cm^{-1} são termicamente mais suscetíveis, quando comparadas aos agregados e voltas- β . O mesmo acontece com as estruturas aleatórias (1645 cm^{-1}) quando comparadas com

as folhas- β em 1632 cm^{-1} , tendo que as estruturas aleatórias são mais suscetíveis termicamente que as folhas- β em 1632 cm^{-1} .

A partir dos dados apresentados acima, temos a seguinte sequência de suscetibilidade térmica para as estruturas secundárias: aleatórias > folhas- β em 1632 cm^{-1} > agregação > voltas- β . Portanto, nessa faixa de temperatura, temos as estruturas aleatórias como as mais suscetíveis, sendo que nessa região de pós-transição, grande parte das estruturas secundárias formam rompidas dando origem as estruturas aleatórias.

Podemos relacionar, para cada transição, a estrutura secundária mais suscetível com os dados entálpicos obtidos pelo DSC. A tabela 4 apresenta um resumo das temperaturas encontradas em ambas as técnicas, a estrutura mais suscetível em cada região e a variação de entalpia de cada transição.

Tabela 4 – Resumo das temperaturas de transição encontradas no DSC e correlação SS – 2D, estruturas secundárias mais sensíveis e o ΔH_{cal} para cada região.

	DSC	SS-2D	VV-2D	ΔH_{cal} (kJ mol⁻¹)
1 ^a região	36°C	31°C	Hélices- α	$0,06 \pm 0,01$
2 ^a região	~ 39°C	~ 37°C	Voltas	$0,41 \pm 0,1$
3 ^a região	~ 43°C	~ 45°C	Folhas- β	$0,80 \pm 0,2$
4 ^a região	~49°C	~ 51°C	Folhas- β	$1,03 \pm 0,1$
5 ^a região (melting)	~59 e 65°C	65°C	Hélices- α	$550,21 \pm 1$
6 ^a região	~71°C	~ 70°C	Aleatórias	$34,00 \pm 0,6$

Para as quatro primeiras regiões temos a variação de entalpia (ΔH_{cal}) de ~ 0,05, 0,4, 0,8 e 1,0 kJ mol⁻¹, respectivamente. Com isso observamos que é pouco provável que ligações não covalentes que estabilizavam as estruturas secundárias (ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto, entre outras), foram rompidas. Portanto estruturas secundárias como hélices- α , voltas- β e folhas- β estejam sob o efeito de flutuações conformacionais.

Para a quinta região (região de transição principal), temos $\Delta H_{\text{cal}} \sim 550 \text{ kJ mol}^{-1}$. Esse valor indica que essa transição é a que mais colabora para o desenovelamento proteico e que as ligações que estabilizam a RNase A, em sua maior parte, foram rompidas. Dentre essas ligações estão as ligações de hidrogênio com uma energia de formação de $10\text{-}30 \text{ kJ mol}^{-1}$ (VOET, D. et al., 2002), e principalmente as pontes dissulfeto com energia de formação $\sim 31 - 54 \text{ kJ mol}^{-1}$ (MICHEL DAUNE, 1993; YUE-JIN LI, et al., 1995). Relacionando os valores de entalpia com as mudanças conformacionais das estruturas secundárias, temos que os rompimentos iniciaram-se nas hélices- α , que são as estruturas mais suscetíveis termicamente, como indicado pela análise VV-2D.

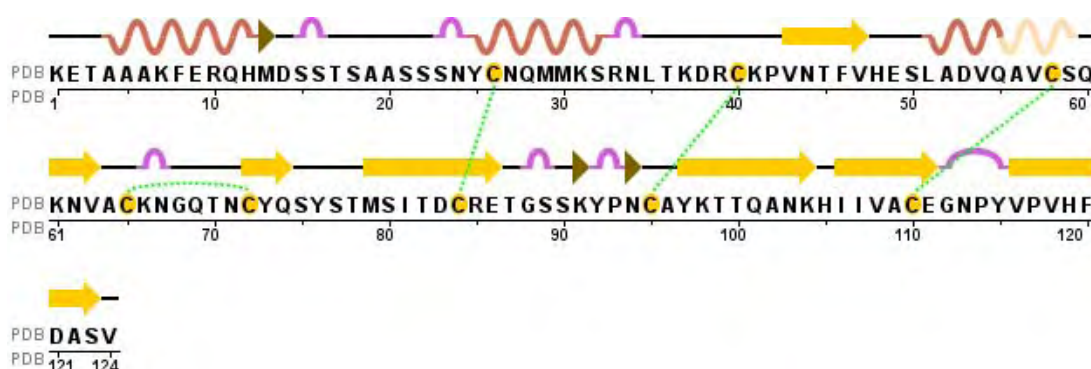


Figura 31 – Sequência de aminoácidos (estrutura primária) e as estruturas secundárias formadas em cada região. Além disso temos indicadas as oito cisteínas da RNase A e as pontes dissulfeto indicadas pelas linhas tracejadas verdes (PDB-5rsa).

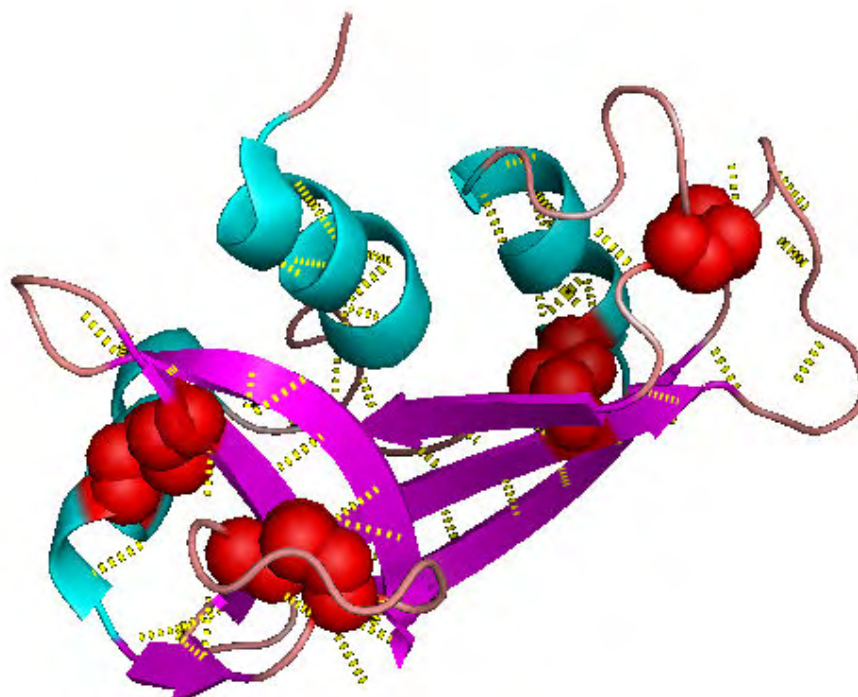


Figura 32 – Estrutura tridimensional da RNase A com as pontes dissulfeto representadas pelas esferas, as estruturas secundárias de hélices- α , folhas- β , voltas- β e aleatórias e as pontes de hidrogênio em pontilhado.

Podemos observar pela sequência (figura 31) e figura 32, que temos quatro pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura proteica. A primeira ponte dissulfeto (C26-C84) está entre hélice- α e folha- β , tendo na região a presença de aminoácidos polares, apolares, além de aminoácidos carregados, como tirosina, asparagina, ácido aspártico e arginina, respectivamente. A segunda ponte dissulfeto (C40-C95) liga duas estruturas de voltas- β , possuindo na região a presença de aminoácidos carregados (positivamente), polares e apolares, como arginina, lisina, asparagina e alanina. A terceira ponte dissulfeto (C58-C110) se forma também entre hélice- α e folha- β , tendo a presença de aminoácidos carregados (negativamente), polares e apolares, como glutamato, serina, valina e alanina. A quarta e última ponte dissulfeto (C65-C72) encontra-se ligando folha- β e voltas- β , tendo a presença de

aminoácidos carregados (positivamente), polares e apolares, como lisina, asparagina, alanina e tirosina, respectivamente.

Temos que duas das três hélices- α presentes na RNase A, estão ligadas a estrutura tridimensional por meio de duas pontes dissulfeto (C26-C84 e C58-C110). Por esse motivo, quando as pontes dissulfeto são rompidas nessa quinta região, temos que as hélices- α passam a serem as estruturas secundárias mais suscetíveis termicamente, por estarem “livres”.

Para a sexta região (região de pós-transição), o valor de $\Delta H_{cal} \sim 34$ kJ mol⁻¹, indicando que ligações ainda restantes na estrutura praticamente desenovelada, ainda estão sendo rompidas, como é o caso das ligações de hidrogênio (energia de formação de 10 - 30 kJ mol⁻¹ cada) (VOET, D. et al., 2002). Por isso é observado a presença de estruturas aleatórias e a formação de agregados, decorrentes do desenovelamento da RNase A.

7- Conclusão

A técnica de DSC foi utilizada na observação de dependência térmica da RNase A. A sequência de aminoácidos presente na RNase A indica a existência de quatro pontes dissulfeto que concede à proteína uma estabilidade térmica, como indicado pelo DSC. Observamos que o termograma é característico de um processo de dois estados, no qual identificamos o valor da variação de entalpia (ΔH_{cal}) a partir da integral da curva de DSC. O valor da entalpia para o processo de desenovelamento foi de aproximadamente 587 kJ mol^{-1} , que se encontra em acordo com a literatura (GUIDO BARONEA, et al., 2008 e SIMONA D. STELEA, et al., 2001). A partir disso, calculamos a variação de entalpia de Van't Hoff ($\Delta H_{VH} \sim 405 \text{ kJ mol}^{-1}$) que é comparada com a entalpia encontrada pelo termograma de DSC. Temos que $\Delta H_{cal} > \Delta H_{VH}$ e $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal} \sim 0,7$, indicando que o desenovelamento térmico da RNase A é um processo com múltiplos estados (meta estados) e não com dois estados (ALAN COOPER, 2001).

Foi possível, a partir da deconvolução, investigarmos a existência de temperaturas de transições no processo de desenovelamento. Foram encontrados temperaturas de pré transição em 36, 39, 43, 49 e 59°C , que foram identificadas mesmo antes da correção de linha de base, uma pós transição em 71°C , bem como a temperatura de transição principal em $\sim 65^{\circ}\text{C}$. Todas essas temperaturas podem servir de pontos de investigação nos quais a RNase A pode estar submetida a mudanças conformacionais. A presença dessas transições confirma o desenovelamento térmico da RNase A como não sendo um processo de dois estados, mas sim com múltiplos estados (MICHAEL C. CHEN, et al., 1976, JING ZHANG, et al., 1995, YOUJIRO TAMURA, et al., 1995 e LI-XU WANG, et al., 2006). Além disso, identificamos também as diversas contribuições entálpicas, quantificando o ΔH_{cal} em cada transição. Esses dados foram apresentados na tabela 4, juntamente com a identificação da localização das temperaturas encontradas pela deconvolução do termograma. Desses dados destacamos que a região da temperatura

de *melting* foi a com maior absorção de energia térmica por parte da RNase A ($\Delta H_{cal} \sim 550 \text{ kJ mol}^{-1}$) e a que mais colaborou para o processo de desenovelamento térmico.

As análises de correlação SS-2D identificaram as temperaturas de pré transição em 31, 37, 45 e 51°C, uma temperatura de pós transição em 70°C, bem como a temperatura de transição principal em $\sim 65^\circ\text{C}$. Esses resultados foram corroborados pelos dados de DSC, pela identificação de praticamente, as mesmas temperaturas de transições em ambas as técnicas. A análise de correlação VV-2D monitorou mudanças conformacionais observadas nessas transições, identificando a sequência de suscetibilidade térmica das estruturas secundárias, bem como a identificação da estrutura secundária mais suscetível termicamente em cada região. A tabela 4 resume as informações obtidas pela análise de correlação 2D, além dos dados obtidos pelo DSC.

As informações obtidas em ambas as técnicas, quando comparadas com os dados já obtidos na literatura, indicam que, tanto pelo DSC como pelo SS-2D, determinamos temperaturas de transição ainda não identificadas (DSC: 36, 39, 49, 59 e 71°C e SS-2D: 31,37,51 e 70°C). Além disso obtivemos pelo DSC, o ΔH para cada uma dessas transições e pela análise VV-2D identificamos qual estrutura secundária é mais suscetível termicamente em cada região de transição.

Esse conjunto de informações sobre o processo de desenovelamento térmico da RNase A nos leva a concluir que as análises de correlação SS-2D e VV-2D, aplicadas à técnica espectroscópica (FTIR), foi capaz de identificar transições durante esse processo, que foram corroborados por dados da técnica de análise térmica (DSC), além da dinâmica conformacional das estruturas secundárias em cada transição, respectivamente. Isso permite a compreensão do desenovelamento protéico a nível estrutural e molecular, possibilitando o entendimento mais aprofundado sobre a RNase A.

8 - Bibliografia

ALAN COOPER. *DSC Interpretation Notes*. Disponível em: <www.chem.gla.ac.uk/staff/alanc/dscbrief.pdf>. Acesso em: 25 abril 2001.

ALAN COOPER. *Thermodynamic analysis of biomolecular interactions*. Analytical techniques, 1999, 557–563.

BARTH, A. *Infrared spectroscopy of proteins*. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, Vol.1767, 1073–1101.

CALLEN, HERBERT B. *Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics*. John Wiley & Sons. 1985, 153-178.

CHARLES H. SPINK. *Methods in cell biology*. New York : Elsevier, 2008, Vol.8, chapter 5, 115-141 p.

CHARLES R. CANTOR, PAUL R. SCHIMMEL. *Biophysical Chemistry*. New York : W. H. Freeman and company, 1980, 1076-1088.

CHRISTIAN B. ANFINSEN. *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973, Vol. 181, 223-230.

CLAUDETE FERNANDES PEREIRA E CELIO PASQUINI. *Espectroscopia de correlação bidimensional: fundamentos, aplicações e perspectivas*. Quím. Nova, 2006, Vol. 29, n°.1, 143-148.

CONCETTA GIANCOLA. *A convenient tool for studying the stability of proteins and nucleic acids*. Journal of thermal analysis and calorimetry, 2008, Vol.91, 78-85.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF MAINE. *Protein Folding*. Orono, 2009. Disponível em: <
<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/1afu.jpg>>. Acesso em: 23 abril 2010.

DIANE REINSTÄDLER, HEINZ FABIAN, JAN BACKMANN AND DIETER NAUMANN. *Refolding of Thermally and Urea-Denatured Ribonuclease A Monitored by Time-Resolved FTIR Spectroscopy*. Biochemistry, 1996, Vol. 35, 15822-15830.

Donald F. Seneart and David C. Teller. *Thermodynamics of Concanavalin A Dimer-Tetramer Self-Association: Sedimentation Equilibrium Studies?*. Biochemistry, 1981, Vol. 20, 3076-3083.

FABRIZIA F.; PAOLA C.; POMPEA D. V. *The effect of trimethylamine n-oxide on RNase A stability a DSC study*. Journal of thermal analysis and calorimetry, 2008, Vol.91, 67-72.

GARLAND R. M.; JIAWEN A. D.; DANIEL J. K. *Back to the future : Ribonuclease A*. Peptide Science 3, 2007, Vol. 90, 259-277.

GEORGE I. MAKHATADZE, KEY-SUN KIM, CLARE WOODWARD AND PETER L. PRIVALOV. *Thermodynamics of BPTI folding*. Protein Science, 1993, Vol. 2, 2028-2036.

GUIDO BARONE, FRANCESCA CATANZANO, POMPEA DEL VECCHIO, CONCETTA GIANCOLA, GIUSEPPE GRAZIANO. *Thermodynamics of protein stability: A family of Ribonucleases*, Biophysical Journal, 2008, Vol. 94, 4056-4065.

HYE JEONG KIM, SEUNG BIN KIM AND JIN KON KIM. *Phase Behavior of a Weakly Interacting Block Copolymer by Temperature-Dependent FTIR Spectroscopy*. Macromolecules, 2006, Vol. 39, 408-412.

ISAO NODA AND CURTIS MARCOTT. *Two-Dimensional Raman (2D Raman) Correlation Spectroscopy Study of Non-oxidative Photodegradation of α -Carotene*. J. Phys. Chem. A, 2002, Vol. 106, 3371-3376.

ISAO NODA, YUKIHIRO OZAKI. *Two dimensional correlation spectroscopy: applications in vibrational and optical spectroscopy*. England: John Wiley & Sons Ltd. 2004, 1-72 p.

JING ZHANG, XIANGDONG PENG, ANA JONAS, G AND JIRI JONAS. *NMR Study of the Cold, Heat, and Pressure Unfolding of Ribonuclease A*. Biochemistry, 1995, Vol. 34, 8631-8641.

JINGGANG ZHAO, KENJI TATANI AND YUKIHIRO OZAKI. *Mechanism of Thermal Phase Transition of a Ferroelectric Liquid Crystal with Monotropic Transition Temperature Studied by Infrared Spectroscopy Combined with Principal Component Analysis and Sample-Sample Two-Dimensional Correlation Spectroscopy*. Applied Spectroscopy, 2005, Vol. 59, 620-629.

JOAN TORRENT, PETER RUBENS, MARC RIBO, KAREL HEREMANS AND MARIA VILANOVA. *Pressure versus temperature unfolding of ribonuclease A: An FTIR spectroscopic characterization of 10 variants at the carboxy-terminal site*. Protein Science, 2001, Vol. 10, 725–734.

JOSE L.R. ARRONDO, N. MARTIN YOUNG AND H. HENRY MANTSCH. *The solution structure of concanavalin A probed by FT-IR spectroscopy*. Biochimica et Biophysica Acta, 1988, Vol. 952, 261-268.

JULIAN M. STURTEVANT. *Some applications of calorimetry biochemistry and biology*. Annual reviews of Biophysics and Bioengineering, 1974, Vol. 3, 35-51.

JULIAN M. STURTEVANT. *Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry*, Annual reviews of Physical and Chemistry, 1987, Vol. 38, 463-488.

KOICHI MURAYAMA AND MIHOKO TOMIDA. *Heat-Induced Secondary Structure and Conformation Change of Bovine Serum Albumin Investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Biochemistry, 2004, Vol. 43, 11526-11532

LADBURY, J.E.; COWDHRY, B.Z. *Biocalorimetry Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. John Wiley: New York, 1998.

LI-XU WANG; FILIP MEERSMAN; YUQING WU. *A principal component and two-dimensional correlation infrared spectroscopy study on the thermal unfolding of ribonuclease A under reducing conditions*. Journal of molecular structure, 2008, Vol. 883-884, 79-84.

LI-XU WANG; YUQING WU; FILIP MEERSMAN. *Two-dimensional correlation infrared spectroscopy study on the conformational changes occurring in thermally induced pretransition of ribonuclease A*. Journal of molecular structure, 2006, Vol. 799, 85-90.

LIYAN YU, BINGREN XIANG. *Two-dimensional near-infrared correlation spectroscopy study the methanol in acidic pH region*. Spectrochimica Acta Part A, 2008, Vol. 71, 965–968.

MICHAEL C. CHEN AND RICHARD C. LORD. *Laser Raman Spectroscopic Studies of the Thermal Unfolding of Ribonuclease A*. Biochemistry, 1976, Vol. 15, 1889-1897.

MICHAEL M. B. *Enzymes of molecular biology*. New Jersey, Totowa : Humana press, 1993, Vol. 16, 263-270.

MICHEL DAUNE. *Molecular Biophysics*. Imperial. New York : Oxford university press, 1993, 101-140.

MOSTAFA REZAEI-TAVIRANI, SEYED HASSAN MOGHADDAMNIA, BIJAN RANJBAR, MOJTABA AMANI AND SAYED-AMIR MARASHI. *Conformational Study of Human Serum Albumin in Pre-denaturation Temperatures by Differential Scanning Calorimetry, Circular Dichroism and UV Spectroscopy*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, Vol. 39, No. 5, 530-536.

MURAYAMA, K.; TOMIDA, M. *Heat-Induced Secondary Structure and Conformation Change of Bovine Serum Albumin Investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Biochemistry, 2004, Vol. 43, 11526-11532.

OLOFSSON, G.; WANG, G. *Polymer-Surfactant System*. Marcel Dekker: New York, 1998.

SIMONA D. STELEA, PETR PANCOSKA, ALBERT S. BENIGHT, AND TIMOTHY A. KEIDERLING. *Thermal unfolding of ribonuclease A in phosphate at neutral pH: Deviations from the two-state model*, Protein Science, 2001, Vol. 10, 970-978.

SLOBODAN ŠAŠIĆ, ANDRZEJ MUSZYNSKI AND YUKIHIRO OZAKI. *A New Possibility of the Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy.I. Sample-Sample Correlation Spectroscopy*. J. Phys. Chem. A, 2000, Vol. 104, 6380-6387.

VLADIMIR P. DENISOV AND BERTIL HALLE. *Thermal Denaturation of Ribonuclease A Characterized by Water 17O and 2H Magnetic Relaxation Dispersion*. Biochemistry, 1998, Vol. 37, 9595-9604.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: ARTIMED, 1ª reimpressão. 2002, 931 p.

WILLIAM J. WEDEMEYER, ERVIN WELKER, MAHESH NARAYAN AND HAROLD A. SCHERAGA. *Disulfide Bonds and Protein Folding*. Biochemistry, 2000, Vol. 39, 4207-4216.

YONG-BIN YAN; JUN ZHANG; HUA-WEI HE; HAI-MENG ZHOU.
Oligomerization and Aggregation of Bovine Pancreatic Ribonuclease A: Characteristic Events observed by FTIR Spectroscopy. Biophysical Journal, 2006, Vol. 90, 2525–2533.

YOUJIRO TAMURA AND KUNIHICO GEKKO. *Compactness of Thermally and Chemically Denatured Ribonuclease A As Revealed by Volume and Compressibility.* Biochemistry, 1995, Vol. 34, 1878-1884

YUE-JIN LI, DAVID M. ROTHWARF AND HAROLD A. SCHERAGA.
Mechanism of reductive protein unfolding. Nature Strutural Biology, 1995, Vol. 2, n° 6, 489-494.