

LIERGE RAMOS

Estudos biofísicos da Hemoproteína extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) na ausência e na presença de surfactantes

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Soares Santiago

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

R175e Ramos, Lierge
Estudos biofísicos da hemoproteína extracelular de
Amyntas gracilis (HbAg) na ausência e na presença de
surfactantes / Lierge Ramos. – Araraquara - SP : [s.n.], 2017
82 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Química
Orientador: Patrícia Soares Santiago

1. Hemoglobina. 2. Espectroscopia de ultravioleta.
3. Agentes ativos de superfície. 4. Oxidação. 5. Anelídeo.
I. Título.

LIERGE RAMOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 11 de agosto de 2017.

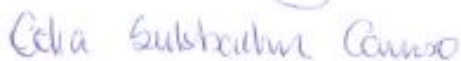
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Patricia Soares Santiago (Orientadora)
Campus Experimental de Registro / UNESP / Registro - SP



Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva
Faculdade de Ciências e Letras / UNESP / Assis - SP



Dr.^a. Célia Sulzbacher Caruso
Instituto de Química / USP / São Carlos - SP

Com imenso carinho dedico este trabalho,

À Deus.

Aos meus pais João Antônio e Maria Neuza.

Aos meus irmãos Vanessa, Elivaldo, Vanuza, Vanderson e Valéria.

Ao meu sobrinho e afilhado João Vitor.

Aos meus cunhados Reginaldo, Rogério e Arnaldo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me concedido a graça de realizar esse sonho. Por ter estado sempre ao meu lado, iluminando o meu caminho, mesmo quando eu não percebia.

Aos meus pais, por terem me dado o dom da vida e me transformado na pessoa que hoje sou. A minha eterna gratidão por toda a preocupação, apoio e amor.

A todos meus irmãos por sempre me incentivarem e pelo carinho.

Ao meu afilhado, presente de Deus, simplesmente por existir.

À minha querida orientadora Patrícia Santiago pela oportunidade concedida, pela paciência e amizade.

Aos meus companheiros de laboratório Claudemir, Jonathan, Gustavo, Raphael, Luana e Raissa pela convivência, alegrias e dificuldades compartilhadas e por toda a ajuda, e principalmente a amizade.

A todos os companheiros do grupo de pesquisa Biomoléculas.

A todos do Grupo de pesquisa de Biofísica do Instituto de Química de São Carlos, em especial ao Prof. Marcel Tabak pelo apoio na pesquisa.

Aos meus queridos amigos Thais, Mateus, Tiago, Rodolfo, Marlon, Milena, Mayara, Amanda, Caio e Vitor pelo ombro amigo e pela força.

Ao Instituto de Química - UNESP por ter me acolhido e permitido a minha formação.

À seção de Pós-graduação, em especial à Célia e Wennia por toda atenção despendida.

A todos os servidores da Unesp - Campus Registro pelo suporte e acolhimento.

À Capes pela bolsa concedida e a FAPESP pelo apoio aos projetos de pesquisa do grupo.

“Nunca se faça de vítima dos acontecimentos. É preciso ser tolerante consigo mesmo e com os outros, para não viver aborrecido por coisas insignificantes. É terrível quando a pessoa vive remoendo críticas. Um caminho seguro para aprender com as derrotas é assumir seus atos, corrigir os erros e não cair no abismo da justificativa barata.” (Padre Léo)

RESUMO

As hemoglobinas constituem um grupo de proteínas que desempenham um papel vital nos organismos. Suas propriedades intrínsecas, assim como a sua relação estrutura-atividade, envolvem fenômenos tais como a cooperatividade e afinidade por ligantes específicos, como o oxigênio, que estão associados a uma variedade de processos que viabilizam a vida. As hemoproteínas, em especial as hemoglobinas de anelídeos têm sido objeto de estudo de diferentes grupos de pesquisa, devido a sua alta estabilidade oligomérica, resistência à oxidação, alta cooperatividade e afinidade por ligantes específicos, apresentando um alto potencial em aplicações biotecnológicas como, por exemplo, substituto sanguíneo. Estudos sobre a caracterização estrutural e a determinação da estabilidade de hemoproteínas na presença de surfactantes, por meio de várias técnicas como absorção ótica, emissão de fluorescência, CD (Dicroísmo Circular) e espalhamento de luz podem trazer informações sobre esta classe de proteínas, principalmente sobre o mecanismo de oxidação, dissociação e desnaturação. Desta forma, no presente projeto de pesquisa objetivou realizar a caracterização biofísica da hemoglobina extraída de *Amyntas gracilis* (HbAg) na presença de surfactantes iônicos (SDS e CTAC) nos valores de pH 5,0 e 7,0. Os resultados nos mostram que ambos os surfactantes são capazes de interagir fortemente com a HbAg, sendo que o pH do meio influencia diretamente na intensidade da interação proteína-surfactante. O SDS em pH 5,0 interage fortemente com a HbAg formando precipitados de complexo proteína-surfactante, podendo ser observados em baixas concentrações de SDS ($0,01 - 0,2 \text{ mmolL}^{-1}$). Enquanto que para o CTAC ocorre uma forte interação entre o surfactante e a HbAg em pH 7,0 em uma faixa de concentração de $0,01 - 0,07 \text{ mmolL}^{-1}$. A formação de agregados nestes sistemas provavelmente ocorre em função do ponto isoelétrico (pI) da HbAg ser ácido ($6,0 \pm 3$), assim como o de outras Hb extracelulares, como resultado de uma forte interação eletrostática. As medidas espectroscópicas indicam que com o aumento da concentração dos surfactantes ocorre a ressolubilização dos agregados. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o SDS e o CTAC promovem o processo de oxidação/dissociação da HbAg em baixas concentrações e que nas concentrações máximas de surfactantes utilizadas neste trabalho o processo de desnaturação da HbAg não é completo.

Palavras-chave: Hemoglobina. Surfactante. Anelídeo.

ABSTRACT

Hemoglobins are a group of proteins that play a vital role in organisms. Their intrinsic properties, as well as their structure-activity relationship, involve phenomena such as cooperativity and affinity for specific ligands, such as oxygen, which are associated with a variety of processes that make life possible. Hemoproteins, especially hemoglobins of annelids have been studied by different research groups, due to their high oligomeric stability, resistance to oxidation, high cooperativity and affinity for specific ligands, presenting a high potential in biotechnological applications, for example, a blood substitute. Studies on the structural characterization and determination of hemoprotein stability in the presence of surfactants by optical absorption, fluorescence emission, CD and light scattering can bring information about this class of proteins, mainly on the mechanism of dissociation and denaturation. Thus, in the present master's project the main objective was to perform biophysics characterization studies, with the hemoglobin extracted from the annelid of *Amyntas gracilis* (HbAg) in the presence of ionic surfactants (SDS and CTAC) at pH values 5,0 and 7,0. The results show that both surfactants are capable of interacting strongly with HbAg, and the pH of the medium directly influences the intensity of the protein-surfactant interaction. SDS at pH 5.0 strongly interacts with HbAg forming precipitates of protein-surfactant complex, can be observed with low concentrations of SDS (0.01 - 0.2 mmolL⁻¹). While for CTAC a strong interaction between surfactant and HbAg occurs at pH 7.0 in a concentration range of 0.01-0.07 mmolL⁻¹. The formation of aggregates in these systems probably occurs as a function of the isoelectric point (*pI*) of HbAg being acid (6.0 ± 3), as well as that of other extracellular Hb, as a result of a strong electrostatic interaction. This study showed that SDS and CTAC promote the oxidation/dissociation process of HbAg at low concentrations and that at the maximum concentrations of surfactants used in this work the denaturing process of HbAg is not complete.

Keywords: Hemoglobin. Surfactant. Annelid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) Estrutura da hemoglobina humana e representação do grupo heme; (B) Representa o sítio de ligação de O_2 e o da histidina proximal. 16
- Figura 2 - Constituição do grupo heme: uma protoporfirina e um átomo de ferro central. 17
- Figura 3 - Representação esquemática da hierarquia do arranjo oligomérico de HbGp na sua estrutura nativa obtida a partir de dados cristalográficos. A HbGp é uma bicamada hexagonal que contém 12 protômeros. Ao todo são 144 cadeias de globinas e 36 estruturas tipo linkers. Os protômeros são constituídos por um dodecâmero de globinas e um heterotrímero de linkers (L1, L2 e L3). As cores utilizadas para diferenciar os tipos de subunidades que compõem o complexo da HbGp foram adotadas como padrão neste trabalho. 20
- Figura 4 - (A) Representação da estrutura de uma proteína em sua forma nativa; (B) Representação de uma estrutura de proteína desnaturada. 22
- Figura 5 - Foto do animal *A. gracilis* fixado para incisão e extração de sua hemolinfa. 26
- Figura 6 - Cromatograma da HbAg, 25 mg/mL, obtido em uma coluna Superdex-200 10/300 GL, equilibrada em tampão Tris-HCl 100 mmolL⁻¹, pH 7,0 a 25°C, utilizando um cromatógrafo AKTA pure (GE). 27
- Figura 7 - Ilustração do diagrama dos níveis de energia eletrônicos de uma molécula, sendo E_0 o nível de energia do estado fundamental e E_1 e E_2 níveis de dois estados excitados. As linhas e_0, e_1, \dots, e_4 representam os níveis vibracionais de energia da molécula. 30
- Figura 8 - Diagrama de Jablonski. Absorção de radiação ($S_0 \rightarrow S_1$); Emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$); Conversão interna e relaxação vibracional ($S_2 \rightarrow S_0$); Cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$); Emissão de fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0$). 32
- Figura 9 - Origem do efeito do CD. (a) As componentes circularmente polarizadas à esquerda (L) e à direita (R) de radiação polarizada no plano: (I) as duas componentes têm a mesma amplitude e quando combinadas geram a radiação polarizada no plano. (II) as componentes têm amplitudes diferentes e a resultante círculo tracejado é polarizado elipticamente. (b) A relação entre os espectros de absorção e de CD. A banda 2 tem um espectro de CD, positivo, com $\epsilon_L > \epsilon_R$; a banda 3 tem um espectro de CD negativo com $\epsilon_R > \epsilon_L$; a banda 1 corresponde a um cromóforo aquiral ou não quiral, sinal de CD nulo. 35

- Figura 10 - Espectros de CD no UV associados a vários tipos de estrutura: (traço e ponto) α -hélices, (traços) folhas- β e (linha cheia) estruturas aleatórias. 36
- Figura 11 - Espectros de absorção óptica da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de SDS, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmolL^{-1} , pH 5,0. Na faixa de concentração de SDS de (A) 0 á $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ e (B) $3,0$ á $15,0 \text{ mmolL}^{-1}$. (C) Inseto da Figura 11B mostrando a região das bandas Q ampliadas. Estas medidas foram realizadas sem centrifugar as amostras. 39
- Figura 12 - Espectros de absorção óptica da HbAg (0,1 mg/mL), em função da concentração de surfactantes iônicos, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmolL^{-1} , pH 5,0. (A) HbAg em função da concentração de SDS, na faixa de 0 á $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$; (C) HbAg em função da concentração de SDS, na faixa de $0,2$ á $15,0 \text{ mmolL}^{-1}$; (B e D) Insetos das Figuras 12A e 12C, respectivamente, mostrando a região das bandas Q ampliadas. (E) HbAg em função da concentração de CTAC, na faixa de 0 á $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$; (G) HbAg em função da concentração de CTAC, na faixa de $0,2$ á $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$; (F e H) Insetos das Figuras 12E e 12G, respectivamente, mostrando a região das bandas Q ampliadas. Todos os espectros foram obtidos após a centrifugação das amostras. 41
- Figura 13 - (A) Absorbância em 415 nm; (B) Inseto da Figura 13A; (C) Absorbância em 360 nm; (D) inseto Figura 13C; (E) Absorbância em 610 nm; (F) inseto da Figura 13E; (G) Absorbância em 700 nm e (H) Comprimento de onda máximo (λ_{max}) da banda de Soret em função da concentração de SDS, pH 5,0; (I) Inseto da Figura 13H. Estes resultados são decorrentes dos apresentados nas Figuras 12A e 12C da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de SDS, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL^{-1} , pH 5,0. 44
- Figura 14 - (A) Absorbância em 415 nm; (B) Absorbância em 360 nm; (C) Absorbância em 610 nm; (D) Absorbância em 700 nm e (E) Comprimento de onda máximo (λ_{max}) da banda de Soret em função da concentração de CTAC, pH 5,0; Estes resultados são decorrentes dos apresentados nas Figuras 12E e 12G da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de CTAC, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL^{-1} , pH 5,0. 46
- Figura 15 - Análises dos espectros de absorção óptica apresentados na Figura 12 pelo método CCA (PERCZEL et al., 1992). (A) Espectros de absorção óptica das espécies obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de SDS, pH 5,0; (B) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [SDS] pH 5,0; (C) Inseto da Figura 15B; (D) Espectros de absorção óptica das espécies obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de CTAC, pH 5,0; (E) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [CTAC] pH 5,0. 48

- Figura 16 - Espectros de emissão de fluorescência da HbAg, pH 5,0, em função da concentração de (A) SDS e (D) CTAC; (B) Área total de emissão de fluorescência da HbAg normalizada pela emissão da HbAg na presença de SDS; (C) inserto da Figura 16B; (E) Área total de emissão de fluorescência da HbAg normalizada pela emissão da HbAg na presença de CTAC; (F) inserto da Figura 16E. As amostras de HbAg ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) foram preparadas em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L^{-1} nos valores de pH 5,0. 50
- Figura 17 - Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg ($0,1 \text{ mg/mL}$), em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L^{-1} em pH 5,0, em função da concentração de SDS (A), (B) inserto da Figura 17A, e em função da concentração de CTAC (C). 52
- Figura 18 - Espectro de dicroísmo circular (CD) para HbAg ($0,1 \text{ mg/mL}$), em tampão fosfato 20 mmol L^{-1} pH 5,0, em função da concentração de SDS (A), e em função da concentração de CTAC (D); Valores de Elipticidade em 220 nm em função da concentração de SDS (B), e em função da concentração de CTAC (E). (C e F) Insertos das Figuras 18B e 18E. 53
- Figura 19 - Elipticidade da HbAg em 195 nm em função da concentração de SDS, pH 5,0 (A), e em função da concentração de CTAC, pH 5,0 (C); Elipticidade em 208 nm em função da concentração de SDS, pH 5,0 (B), e em função da concentração de CTAC, pH 5,0 (D). Estes dados foram obtidos dos espectros apresentados na Figura 18. 54
- Figura 20 - Análises dos espectros de CD apresentados na Figura 18 pelo método CCA (PERCZEL et al., 1992). (A) Espectros de CD das espécies puras obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de SDS, pH 5,0; (B) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [SDS] pH 5,0; (C) Inserto da Figura 20B; (D) Espectros de CD das espécies puras obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de CTAC, pH 5,0; (E) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [CTAC] pH 5,0; (F) Inserto da Figura 20E. 55
- Figura 21 - (A e B) Espectros de absorção óptica da HbAg ($0,1 \text{ mg/mL}$), em função da concentração de CTAC, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0. Os espectros foram coletados após 3 horas de equilíbrio e sem centrifugação prévia. 58
- Figura 22 - (A e C) Espectros de absorção óptica da HbAg ($0,1 \text{ mg/mL}$), em função da concentração de SDS, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmol L^{-1} , pH 7,0; (B e D) Insertos das Figuras 22A e 22C mostrando a região das bandas Q ampliadas. (E e G) Espectros de absorção óptica da HbAg ($0,1 \text{ mg/mL}$), em função da concentração de CTAC, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio

30 mmolL⁻¹, pH 7,0; (F e H) Insetos das Figuras 22E e 22G mostrando a região das bandas Q ampliadas. 59

Figura 23 - (A) Absorbância em 415 nm; (B) Absorbância em 610 nm; (C) Absorbância em 360 nm; (D) Absorbância em 700 nm e (E) Comprimento de onda máximo (λ_{max}) da banda de Soret em função da concentração de SDS, pH 7,0. Estes resultados são decorrentes dos apresentados nas Figura 22A e 22C da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de SDS, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹, pH 7,0. 61

Figura 24 - (A) Absorbância em 415 nm; (B) Inseto da Figura 24A; (C) Absorbância em 610 nm; (D) Absorbância em 360 nm; (E) Absorbância em 700 nm e (F) Comprimento de onda máximo (λ_{max}) da banda de Soret em função da concentração de CTAC, pH 7,0. Estes resultados são decorrentes dos apresentados nas Figura 22E e 22G da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de CTAC, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹, pH 7,0. 63

Figura 25 - Análises dos espectros de absorção óptica apresentados na Figura 22 pelo método CCA (PERCZEL et al., 1992). (A) Espectros de absorção óptica das espécies puras obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de SDS, pH 7,0; (B) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [SDS] pH 7,0; (C) Inseto da Figura 25B; (D) Espectros de absorção óptica das espécies puras obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de CTAC, pH 7,0; (E) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [CTAC] pH 7,0; (F) Inseto da Figura 25E. 65

Figura 26 - Espectros de emissão de fluorescência da HbAg, pH 7,0, em função da concentração de SDS (A) e CTAC (D); Área total de emissão de fluorescência da HbAg normalizada pela emissão da HbAg na presença de SDS (B), (C) inseto da Figura 26B, e na presença de CTAC (E); (F) Inseto da Figura 26E. As amostras de HbAg (0,1 mgmL⁻¹) foram preparadas em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹ nos valores de pH 7,0. 66

Figura 27 - Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg (0,1 mg/mL), em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹ em pH 7,0, em função da concentração dos surfactantes (A) SDS e (B) CTAC; (C) Inseto da Figura 27B. 67

Figura 28 - Espectro de dicroísmo circular da HbAg (0,1 mg/mL), em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹ pH 7,0, em função da concentração dos surfactantes (A) SDS e CTAC (D); (B) Elipticidade em 220 nm em função da concentração de SDS; (E) Elipticidade em 220 nm em função da concentração de CTAC; (C e F) insetos das Figuras 29B e 29E. 69

Figura 29 - Elipticidade da HbAg em 195 nm em função da concentração de SDS, pH 7,0 (A), e em função da concentração de CTAC (D); (B) Inseto da Figura 29A ;(C) Elipticidade em 208 nm em função da concentração de SDS e em função da concentração de CTAC (E). Estes dados foram obtidos dos espectros apresentados na Figura 28. 70

Figura 30 - Análises dos espectros de CD apresentados na Figura 28 pelo método CCA (PERCZEL et al., 1992). (A) Espectros de CD das espécies obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de SDS, pH 7,0; (B) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [SDS] pH 7,0; (C) Espectros de CD das espécies obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de CTAC, pH 7,0; (D) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [CTAC] pH 7,0; (E) Inseto da Fig, 28D. 71

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina de soro bovino

CCA – Análise de restrição convexa (do inglês “Convex Constraint Analysis”)

CD – Dicroísmo circular

CMC – Concentração micelar crítica

CTAC – Cloreto de cetiltrimetilamônio

Dh – Diâmetro hidrodinâmico

DLS – Espalhamento de luz dinâmico (do inglês “Dynamic Light Scattering”)

Hb – Hemoglobina

HbAg – Hemoglobina de *Amyntas gracilis*

HbGp – Hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*

HbLt – Hemoglobina de *Lumbricus terrestris*

Hbs – hemoglobinas

LMCT – Transferência de carga ligante-metal

Phe – Fenilalanina

pI – Ponto isoelétrico

SAX – Espalhamento de luz de Raio-X de baixo ângulo (do inglês “Small-angle X-ray scattering”)

SDS – Dodecilsulfato de sódio

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

λ – Comprimento de onda

$\lambda_{\text{máx}}$ – Comprimento de onda de absorção máxima

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1	Hemoproteínas	15
1.2	Hemoglobinas extracelulares gigantes	18
1.3	Desnaturação de proteínas	21
2	OBJETIVOS	24
2.1	Geral	24
2.2	Específicos	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Reagentes	25
3.2	Anelídeo <i>Amyntas gracilis</i>	25
3.3	Extração e purificação da HbAg	25
3.4	Preparo das amostras para as análises espectroscópicas	27
3.5	Absorção ótica	29
3.6	Emissão de fluorescência	31
3.7	Intensidade de espalhamento de luz	33
3.8	Medidas de Dicroísmo Circular	34
3.9	Método CCA	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Interação entre a HbAg em pH 5,0 com os surfactantes SDS e CTAC	38
4.1.1	Medidas de absorção ótica	38
4.1.2	Emissão de fluorescência	48
4.1.3	Medidas de LSI	50
4.1.4	Medidas de CD	52
4.2	Interação entre a HbAg em pH 7,0 com os surfactantes SDS e CTAC	57
4.2.1	Medidas de absorção ótica	57
4.2.2	Emissão de fluorescência	65
4.2.3	Medidas de LSI	67
4.2.4	Medidas de CD	68
5	CONCLUSÃO	75
	Perspectiva futura	76
	REFERÊNCIAS	77

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Hemoproteínas

As proteínas são moléculas que desempenham várias atividades no meio biológico. Podem atuar como enzimas, constituintes estruturais, defesa e transporte em vários sistemas biológicos. Basicamente são constituídas por carbono, hidrogênio, enxofre, nitrogênio, oxigênio e podem apresentar átomos de metal em sua estrutura (STRYER, 1995).

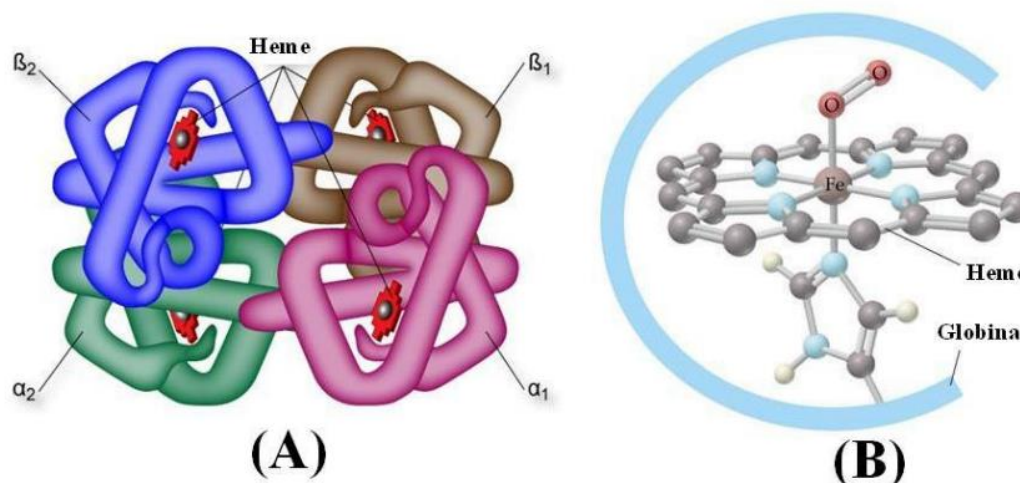
As hemoproteínas são uma das classes de proteínas que são amplamente estudadas, são denominadas como proteínas globulares. Elas apresentam o grupo prostético heme, que é responsável em lhes proporcionar a cor vermelha. As transições eletrônicas do heme podem sofrer alterações devido ao estado de oxidação do ferro e ao seu ligante, provocando alterações na intensidade de sua coloração (EATON; HOFRICHTER, 1983; STRYER, 1995). As hemoproteínas possuem importantes princípios de conformação, função e dinâmica, e por meio do entendimento de sua estrutura tridimensional obtemos informações sobre seu processo de enovelamento e como se ligam com outras moléculas (STRYER, 1995; NELSON; COX, 2006; ROUSSELOT et al., 2006).

As globinas apresentam um dos sistemas mais importantes dentro da química das proteínas. As características singulares das hemoproteínas relacionados à sua estrutura-atividade, tais como cooperatividade e especificidade por ligantes estão associados a diversos mecanismos que possibilitam a vida (STRYER, 1995; KREBS et al., 1996; KUCHUMOV et al., 1999).

Dentro da classe das hemoproteínas destaca-se a Hb humana sendo a mais estudada, e utilizando a técnica de cristalografia de raios-X foi obtida sua estrutura. Este trabalho foi realizado por Max Perutz em 1959 revelando uma proteína esférica, com dimensões de $6,5 \times 5,5 \times 5 \text{ nm}^3$ e 64 kDa de massa molecular. Foi descoberto também que a Hb possui um arranjo tetraédrico constituído por quatro cadeias polipeptídicas de globinas, com estruturas e funções similares entre si. Foram denominadas de cadeias α e cadeias β e estão organizadas de maneira alternada na estrutura da Hb (cadeias α - β - α - β). Essas quatro cadeias são ligadas por ligações não covalentes, ou seja, por ligações de hidrogênio, pontes salinas e interações de Van der Waals, entre os resíduos presentes na interface de cada cadeia (STRYER,

1995; NELSON; COX, 2006). No interior de cada cadeia globínica encontra-se um grupo heme como apresentado na Figura 1.

Figura 1 – (A) Estrutura da hemoglobina humana e representação do grupo heme; (B) Representa o sítio de ligação de O_2 e o da histidina proximal.



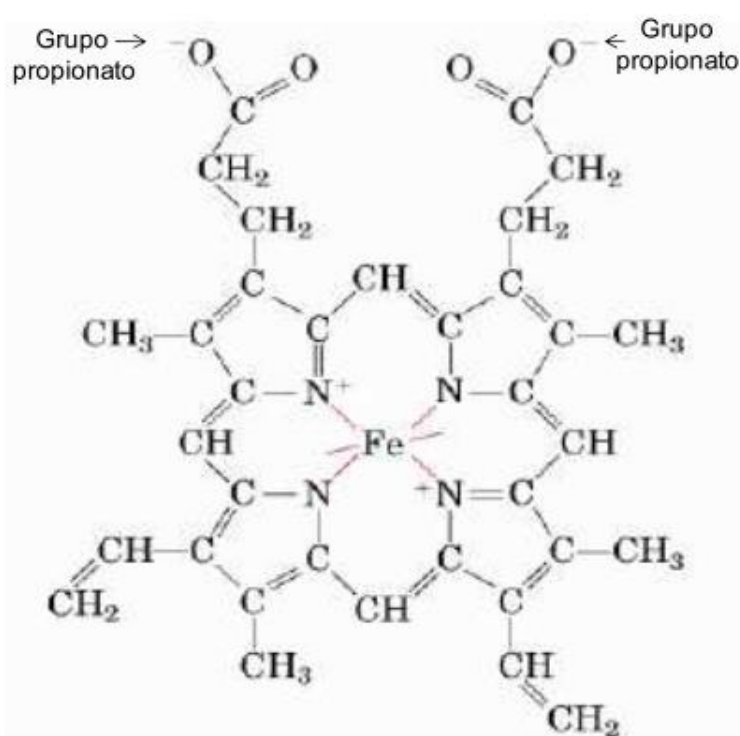
Fonte: Voet (2006).

O grupo heme é formado por quatro anéis pirrólicos coplanares ligados entre si e com um átomo de ferro central, que se encontra a 0,3 Å fora do plano da porfirina coordenado aos átomos de nitrogênios do anel da porfirina, como mostra a Figura 1 (EATON; HOFRICHTER, 1983; STRYER, 1995; VOET, 2006). O metal ferro do grupo heme está coordenado a quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico e pode formar mais duas ligações adicionais, uma de cada lado do plano do grupamento heme. A histidina proximal ocupa a quinta coordenação induzindo com que o átomo de ferro não fique no plano da porfirina, tornando a estrutura assimétrica (EATON; HOFRICHTER, 1983; STRYER, 1995).

A coordenação com o O_2 ocorre do lado oposto da histidina proximal no grupo heme, sendo que essa ligação $Fe-O_2$ possibilita o transporte de O_2 que é primordial para a respiração celular e manutenção da vida. A histidina distal pode ocupar a sexta coordenação do ferro na ausência da molécula de O_2 , (EATON; HOFRICHTER, 1983; STRYER, 1995). A aproximação da histidina distal poderá ser decorrente do processo de desnaturação e dissociação das hemoglobinas (RIFKIND et al., 1994). Portanto, quando o imidazol da histidina distal está coordenado ao ferro na sexta posição, dependendo do estado de oxidação do metal pode-se formar hemicromo (Fe^{3+} , ou seja, a forma oxidada da Hb) ou hemocromo (Fe^{2+} , forma reduzida e também chamada de desoxi-Hb) (RIFKIND et al., 1994).

O grupo heme está completamente no interior da estrutura proteica (conhecido como “Bolsão Hidrofóbico”), exceto sua extremidade que contém dois grupos polares propionatos que estão direcionados para fora e envolvidos por moléculas de água (STRYER, 1995; NELSON; COX, 2006). Com exceção das duas histidinas (distal e proximal), o entorno do grupamento heme é constituído por aminoácidos apolares, Figura 2 (EATON; HOFRICHTER, 1983; NELSON; COX, 2006).

Figura 2 - Constituição do grupo heme: uma protoporfirina e um átomo de ferro central.



Fonte: Nelson e Cox (2006).

O Transporte de O₂ pela Hb é realizado de modo cooperativo, isto é, a ligação de uma molécula de O₂ ao ferro do grupo heme de uma globina facilita a coordenação de O₂ em outros hemes da mesma Hb, vale salientar que o processo inverso (retirada da molécula de O₂) também é cooperativo (STRYER, 1995; KREBS et al., 1996). Além disso, a Hb promove o transporte de CO₂ formados nos tecidos, resultantes da atividade metabólica para os capilares alveolares nos pulmões. O CO₂ que é transportado pela Hb é ligado em resíduos das cadeias α e β na forma de íon bicarbonato (HCO₃⁻) e não ligado ao átomo de ferro do grupo heme (EATON; HOFRICHTER, 1983; STRYER, 1995; NELSON; COX, 2006).

A Hb em sua forma nativa nos organismos possui o átomo de Fe na forma reduzida (Fe^{2+}), ou seja, o Fe está ligado aos quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico e a uma histidina proximal, estando à sexta coordenação livre para ligar-se ao O_2 . Nestas condições a Hb pode ser chamada de oxi-Hb (RIFKIND et al., 1994; NELSON; COX, 2006). Entretanto, no caso da sexta coordenação do Fe^{2+} não estiver ligada ao O_2 e ligada ao NO (nitrosila) ou CO (carboxi), entre outros, teremos a desoxi-Hb (EATON; HOFRICHTER, 1983; NELSON; COX, 2006).

Durante o processo de oxidação da Hb ocorre à transição de Fe^{2+} para Fe^{3+} , neste caso a hemoproteína perde sua função biológica ficando impossibilitada de ligar-se ao O_2 (meta-Hb) (VOET, 2006). Porém durante o processo de oxidação a sexta coordenação pode ser ocupada por outros ligantes e originar outras espécies de meta-Hb, ou seja, quando a sexta posição é ocupada pela molécula de água temos aquometa-Hb, quando liga-se ao cianeto (CN^-) ocorre a cianometa-Hb (EATON; HOFRICHTER, 1983; RIFKIND et al., 1994).

Os processos de oxidação do heme, dissociação e desnaturação de hemoproteína pode ser utilizado para estudos estruturais e de caracterização biofísica desta classe de proteínas, podendo facilitar a compreensão de suas propriedades funcionais (EATON; HOFRICHTER, 1983; STRYER, 1995; NELSON; COX, 2006). As proteínas globulares são ricas em estruturas secundárias como α -hélices, folhas- β e “random coil” denominadas de estruturas desordenadas ou aleatórias, em menor quantidade (KUCHUMOV et al., 1999; ROUSSELOT et al., 2006). Sendo que a hemoglobina e a mioglobina humana são dois exemplos bem conhecidos de proteínas globulares ricas em α -hélices, folhas- β (VOET, 2006; NELSON; COX, 2006).

1.2 Hemoglobinas extracelulares gigantes

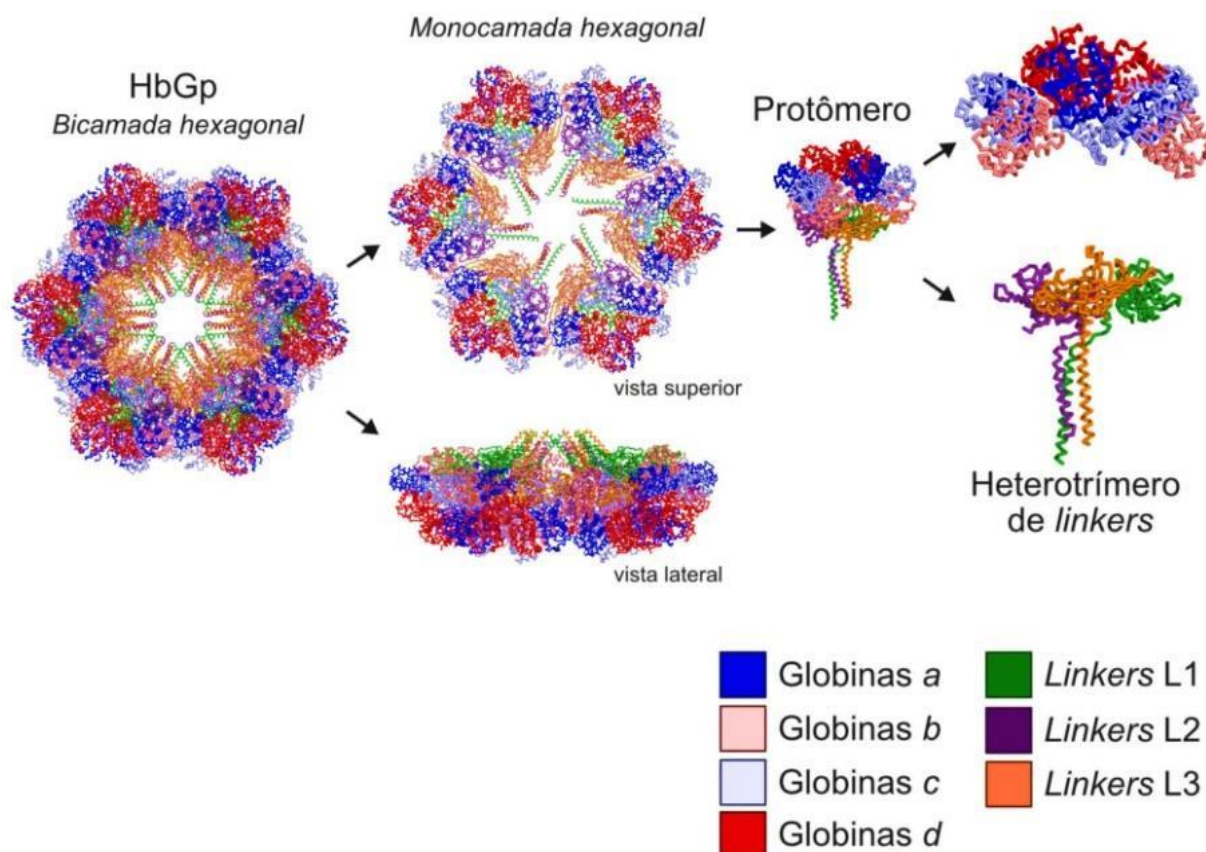
Nas últimas décadas houve um aumento no número de pesquisas voltadas ao estudo das Hbs (Hemoglobinas) de invertebrados, pois apresentam algumas similaridades com a dos vertebrados, embora a constituição e organização das subunidades sejam diferentes das Hbs de vertebrados. Dentre as Hbs de invertebrados destaca-se a Hb extracelular gigante de anelídeos, que vem sendo estudada há muitos anos por diferentes grupos de pesquisas (VINOGRADOV, 2004; TABAK et al., 2012).

O interesse em estudar as hemoglobinas extracelulares gigantes é devido à alta estabilidade oligomérica, resistência à oxidação, alta cooperatividade e afinidade para ligar oxigênio. Tais propriedades tornam as hemoglobinas extracelulares bastante singulares e interessantes para estudos com aplicações biotecnológicas, como por exemplo: substituto sanguíneo. Grupos de pesquisas no mundo vêm estudando as hemoglobinas de *Lumbricus terrestris* (HbLt), *Arenicola marina* (HbAm) e *Glossoscolex paulistus* (HbGp) com o foco nestas aplicações (KUCHUMOV et al., 1999; CHABASSE et al., 2006; TABAK et al., 2012). Uma marcante característica das hemoproteínas extracelulares gigantes é presença de uma grande quantidade de subunidades com pesos moleculares entre 16 – 19 kDa, o que lhes confere uma massa molecular total em torno de 3,0 – 4,0 MDa.

Os dados da estrutura cristalográfica da HbLt, com uma resolução de 3,5 Å, mostra que as subunidades da HbLt apresentam uma disposição em bicamada hexagonal e por meio de dados de dados de sequenciamento e espectroscopia de massa observaram que a massa molecular é de 3,9 MDa (VINOGRADOV, 1986; ROYER et al., 2006). Em concordância com estes relatos foi observado que a HbGp apresenta uma massa molar de 3,6 MDa determinada por ultracentrifugação analítica e com uma resolução de 3,2 Å. Também foi observado que esta hemoglobina é formada por uma bicamada hexagonal, composta por 12 protômeros (CARVALHO F et al., 2009; BACHEGA et al., 2015).

Os dados cristalográficos apontam uma similaridade estrutural entre a HbGp e a HbLt. A Figura 3 é uma representação esquemática da hierarquia do arranjo oligomérico da HbGp na sua estrutura nativa obtida a partir dos dados cristalográficos. Essas hemoproteínas possuem uma disposição altamente organizada com 144 cadeias polipeptídicas que possuem o grupo heme e 36 cadeias polipeptídicas sem os grupos hemes, chamadas de linkers (ROYER et al., 2006; BACHEGA, 2015). Um protômero é formado por um dodecâmero $(abcd)_3L_3$, isto é, contém três tetrâmeros (abcd) e três linkers (L_3). A HbGp e a HbLt são constituídas por quatro subunidades globínicas (a,b,c,d) que possuem o grupo heme, sendo que as cadeias a , b e c estão ligadas por meio de pontes di-sulfeto formando o trímero abc e a cadeia d mantém-se na forma monomérica (ROYER et al., 2006). As cadeias linkers estão relacionadas com a manutenção da estrutura oligomérica das Hbs (Hemoglobinas).

Figura 3 - Representação esquemática da hierarquia do arranjo oligomérico de HbGp na sua estrutura nativa obtida a partir de dados cristalográficos. A HbGp é uma bicamada hexagonal que contém 12 protômeros. Ao todo são 144 cadeias de globinas e 36 estruturas tipo linkers. Os protômeros são constituídos por um dodecâmero de globinas e um heterotrímero de linkers (L1, L2 e L3). As cores utilizadas para diferenciar os tipos de subunidades que compõem o complexo da HbGp foram adotadas como padrão neste trabalho.



Fonte: Bachega (2013).

A HbLt foi comumente estudada no Canadá devido ocorrência do animal no hemisfério norte. Suas subunidades são bem conhecidas em termos de sequência primária e sua estrutura tem sido estudada por técnicas cristalográficas pelo grupo de W.E. Royer Jr. (ROYER et al., 2006). A HbGp vem sendo estudada por pesquisadores do estado de São Paulo, Brasil, onde por meio de diferentes estudos biofísicos, cristalográficos e de sequenciamento tem se observado grande similaridade entre a HbGp e a HbLt (SANTIAGO et al., 2007; TABAK, et al, 2012; BACHEGA et al., 2015; CARVALHO F et al., 2016; CARVALHO J et al., 2016).

Zhu et al. (1996) relatam que a associação e dissociação das subunidades da estrutura da HbLt são dependentes do estado de oxidação do ferro do grupo heme da hemoproteína. A estrutura $(abcd)_3$ é oxidada pelo ferricianeto e sofre completa

dissociação em monômeros *d* e trímeros *abc*, mas a adição de CN^- mantém o complexo $(abcd)_3$ ou contribui para a re-associação das subunidades oxidadas. Também é constatado que a presença de cátions divalentes como Ba (II), Ca (II), Sr (II) e Mg (II) inibem o processo de dissociação e auto-oxidação da HbLt, reduzindo a velocidade da reação. Isto ocorre porque esses cátions divalentes produzem um grande efeito na ligação do oxigênio. A função destes cátions na estabilização da forma oxi-HbLt consiste em evitar a dissociação do oxigênio, que é geralmente a primeira etapa para a formação da espécie oxidada de Hb (meta-Hb) (HARRINGTON, 1994).

Assim, estudos físico-químicos destas hemoproteínas são relevantes tendo em vista o maior entendimento dos processos de dissociação, re-associação e desnaturação envolvidos em diferentes condições de temperatura e composição do meio. Estes processos podem levar a perda da estrutura nativa, bem como a perda de sua função original, de carregador de oxigênio no organismo de invertebrados (KUCHUMOV et al., 1999; VINOGRADOV, 2004).

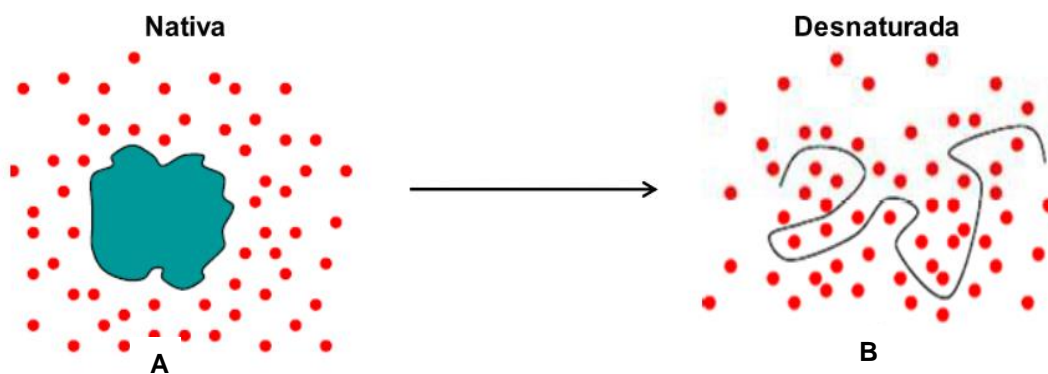
Assim, estudos sobre a caracterização estrutural e a determinação da estabilidade de hemoproteínas em diferentes condições (sob altas temperaturas, presença de agentes caotrópicos, como os surfactantes, e ureia e em diferentes valores de pH), por meio de várias técnicas espectroscópicas como absorção ótica, emissão de fluorescência, dicroísmo circular (CD), espalhamento de luz dinâmico (do inglês “Dynamic Light Scattering” - DLS) e espalhamento de Raio-X de baixo ângulo (do inglês “Small-angle X-ray scattering” - SAXS) podem trazer informações relevantes sobre esta classe de proteínas, principalmente sobre o mecanismo de dissociação e desnaturação.

1.3 Desnaturação de proteínas

Em geral as proteínas apresentam uma estrutura tridimensional característica, organizada em função de um equilíbrio de forças entre o solvente do meio e suas subunidades (KREBS et al., 1996; ZHU et al., 1996; RIGGS, 1998; BRAMANTI et al., 2006). O processo de desnaturação de proteínas envolve um desequilíbrio e perturbação que acarreta no rompimento das forças que mantém sua estrutura conformacional nativa, pela quebra de ligações não covalentes, levando a alterações nas estruturas secundária, terciária e quaternária da proteína (ZHU et al., 1996; KREBS et al., 1996).

Estas alterações estruturais promovem a perda da atividade da proteína, em consequência do desenovelamento (do inglês “unfolding”) dessas estruturas (Figura 4). Os principais agentes indutores envolvidos no processo de desnaturação de proteína são: o aumento da temperatura, solventes orgânicos que alteram a constante dielétrica do meio, mudanças drásticas no pH e a presença de agentes químicos específicos em solução (agentes caotrópicos como ureia, cloreto de guanidina e surfactantes) que causam à ruptura da conformação nativa (HARDING & CHOWDHRY, 2000; CHAIRES, 2008).

Figura 4 - (A) Representação da estrutura de uma proteína em sua forma nativa; (B) Representação de uma estrutura de proteína desnaturada.



Fonte: Nelson e Cox (2006).

Alguns estudos relatam o efeito da desnaturação na estrutura secundária e terciária de hemoproteínas, como por exemplo, podemos citar mudanças no tamanho e forma das estruturas (BISPO et al., 2005; BISPO et al., 2007). Santiago e colaboradores (2008) usando a técnica de DLS com a hemoglobina gigante HbGp, em pH 7,0, relatam que acima de 52° C a hemoproteína se desnaturou levando a um aumento no tamanho do diâmetro hidrodinâmico (Dh) de 27 nm para 65 nm. No entanto, a HbGp a 25° C em pH 7,0 é muito estável, não alterando seu Dh de 27 nm por um período de 72 horas. Em valores de pH acima de 9,0 foi observado o processo de dissociação da proteína resultando em uma partícula com Dh de 10 nm, o que pode ser associado à unidade dodecâmero (*abcd*)₃, de acordo com o trabalho de Krebs et al. (1996), da hemoproteína HbLt.

Em outros estudos foi observado que a HbLt após sofrer o processo de dissociação oligomérica, pode se re-associar na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+}

recuperando em torno de 30% da sua estrutura oligomérica. Porém, não foi esclarecido se as espécies re-associadas possuem a mesma atividade da hemoproteína nativa (KREBS et al., 1996). Por outro lado, após a desnaturação da HbLt, mesmo na presença de cátions divalentes, não é observado a re-associação de subunidades. Por isso, torna-se bastante interessante estudar condições onde não temos o processo de desnaturação estabelecido. Baixas concentrações de ureia (menos de $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$), baixas concentrações de surfactantes, temperaturas e pressão hidrostática menor que pontos críticos de agregação/desnaturação podem acelerar a oxidação e dissociação da Hb que não resulte em sua desnaturação (POLI et al., 2006; BISPO et al., 2007; CHAIRES, 2008).

A interação da HbGp com surfactantes iônicos apresenta uma abordagem interessante e de grande relevância interdisciplinar, uma vez que os surfactantes são largamente empregados em bioquímica e biotecnologia para a solubilização proteica, purificação, caracterização e determinação de estrutura de algumas proteínas (SANTIAGO, et al., 2007). Estudos espectroscópicos da HbGp mostraram que esta se dissocia em pH alcalino, na presença de surfactantes ($0,6 \text{ mmolL}^{-1}$) e em baixas concentrações de ureia (abaixo de $4,0 \text{ mmolL}^{-1}$) (CARVALHO J, et al 2013; CARVALHO F, et al., 2013ab). Alguns destes resultados sugerem que a hemoglobina na forma oxidada (meta-HbGp) é menos estável em relação ao arranjo oligomérico do que a espécie oxi-HbGp, isto é, a oxidação da proteína favorece a sua dissociação oligomérica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar estudos da estabilidade da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (Autor descritor da espécie) (HbAg) por meio de diferentes técnicas biofísicas frente aos processos de dissociação oligomérica, de oxidação do grupo heme, de desnaturação e avaliar a interação da HbAg com surfactantes iônicos. Estes estudos visaram aprofundar o conhecimento em nível molecular das interações entre as subunidades responsáveis pela manutenção da estrutura oligomérica da hemoglobina extracelular gigante HbAg.

2.2 Específicos

1. Extração e purificação da HbAg por meio de ultracentrifugação e cromatografia de exclusão por tamanho.
2. Caracterização biofísica da HbAg na forma nativa e na presença de diferentes concentrações de surfactantes iônicos (CTAC e SDS) por meio de diferentes técnicas como absorção ótica, fluorescência, espalhamento de luz e dicroísmo circular (CD) utilizando a HbAg na concentração de 0,1 mg/mL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Para o preparo das soluções de tampão misto (acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹), os reagentes Acetato de Sódio Anhidro 99%, Tetraborato de Sódio Decahidrato 99,5% e Fosfato de sódio monobásico 98%, foram adquiridos da SIGMA. Os surfactantes iônicos utilizados na titulação das amostras foram o Dodecilsulfato de sódio 99% (SDS) e Cloreto de cetiltrimetilamônio 98% (CTAC). Ambos os surfactantes foram adquiridos da SIGMA.

Os dois surfactantes iônicos foram escolhidos por apresentarem cargas opostas e tamanho aproximado, além de terem sido utilizados por outros em trabalhos envolvendo outras hemoproteínas como a hemoglobina gigante de *Glossoscólex paulistus*, que é ortóloga a HbAg. O SDS apresenta uma cadeia carbônica de metileno com 12 carbonos ligados ao grupo polar sulfato e o CTAC uma cadeia com 16 carbonos e um grupo polar composto por um cloreto de amônia quaternária .

3.2 Anelídeo *Amyntas gracilis*

A hemoglobina extracelular em estudo foi extraída a partir da espécie *Amyntas gracilis* (KINBERG, 1867) pertencente à classe olichaeta, família megascolecidae e do gênero *Amyntas*, sendo que as características físicas de cada espécime limitam-se a um comprimento que varia de 80 a 120 mm, diâmetro de 4 a 7 mm e massa de 4 a 6 g. A obtenção dos espécimes foi realizada por meio da empresa Minhobox, situada na cidade de Juiz de Fora – MG.

3.3 Extração e purificação da HbAg

A etapa inicial de extração e purificação da HbAg foi realizada no laboratório de Biomoléculas da Unesp, Campus Experimental de Registro - SP. Para cada extração da hemolinfa foi utilizado 120 animais e cada animal foi anestesiado com água gelada por um período de 15 a 20 min. Foi realizada uma incisão na parte superior do animal, numa região próxima a cabeça para evitar as enzimas digestivas.

Em seguida a hemolinfa foi coletada com uma pipeta pasteur até o esgotamento do animal adicionando citrato de sódio 0,1 mmolL⁻¹ na hemolinfa para evitar a coagulação como mostra a Figura 5.

Figura 5 - Foto do animal *A. gracilis* fixado para incisão e extração de sua hemolinfa.

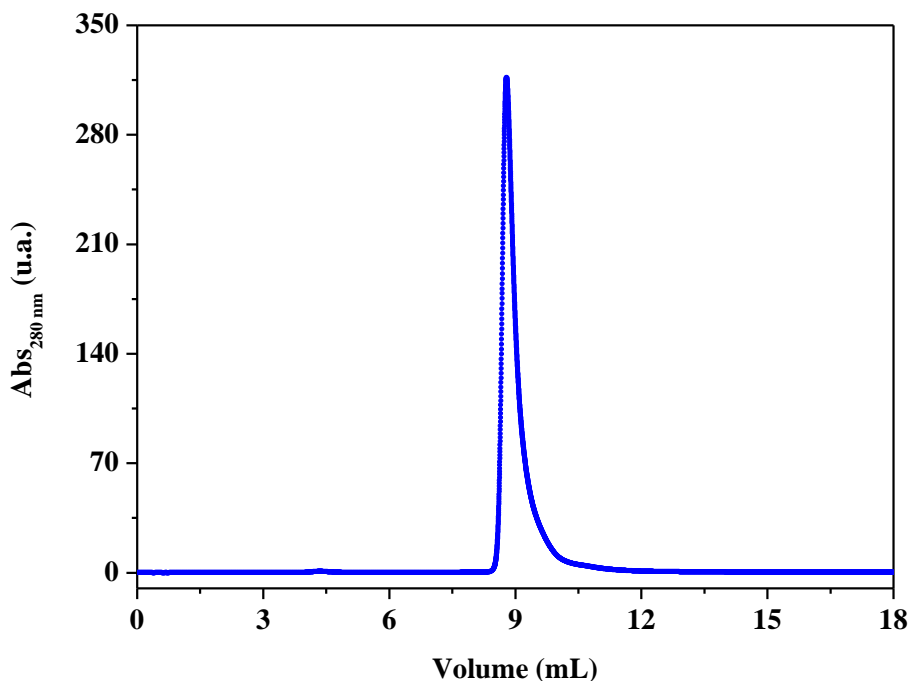


Fonte: Autor.

Em seguida, o estoque de hemolinfa foi centrifugado, a 5.000 rpm (3.000 x g), por 15 min e a 4°C, para eliminar restos de células e resíduos, seguido por 12 horas de diálise em uma membrana de corte de 30 kDa contra tampão tris-HCl 100 mmolL⁻¹, pH 7,0. Depois de dialisada, a hemolinfa foi ultracentrifugada a 60.000 rpm (250.000 x g) por 4 horas à 4°C para sedimentar a HbAg. A proteína foi obtida na forma de “pellet”, sedimentada no fundo do tubo, sendo ressuspensa em um volume de 3 – 4 mL de tampão tris-HCl 100 mmolL⁻¹, pH 7,0, e armazenada a 4°C na geladeira.

Posteriormente, alíquotas de 1,0 mL de hemolinfa foram purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho, em uma coluna de Sephadex G-200 (ou na coluna SUPERDEX 200) equilibrada em tampão tris-HCl 100 mmolL⁻¹, pH 7,0. Este procedimento foi realizado até que toda a hemoglobina ressuspensa fosse purificada. Na Figura 6 é apresentado o cromatograma da HbAg na sua forma íntegra após o processo de purificação, evidenciando a completa purificação da HbAg.

Figura 6 - Cromatograma da HbAg, 25 mg/mL, obtido em uma coluna Superdex-200 10/300 GL, equilibrada em tampão Tris-HCl 100 mmolL⁻¹, pH 7,0 a 25°C, utilizando um cromatógrafo AKTA pure (GE).



Fonte: Autor.

Todas as concentrações foram determinadas espectroscopicamente utilizando o valor de absorvidade molar $\epsilon_{415 \text{ nm}} = 5,1 \pm 0,6 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ determinado pelo método de Lowry. O valor encontrado de absorvidade molar para a HbAg em 415 nm está de acordo com o encontrado para a HbGp (CARVALHO F et al., 2011; CARVALHO J et al., 2012). A HbAg foi armazenada a 4 °C para os posteriores ensaios de caracterização. Após todo o processo de purificação obtivemos um volume final de HbAg de 4,0 mL com concentração final de 30 mg/mL. Durante a execução do referido projeto de mestrado (20 meses) foram realizadas cerca de cinco extrações/purificações da HbAg.

3.4 Preparo das amostras para as análises espectroscópicas

Os estudos espectroscópicos da HbAg em função da concentração de surfactantes foram realizados por meio da preparação de várias amostras distintas

de proteína, onde em cada amostra foi adicionado uma determinada concentração de surfactante, garantindo que a concentração de HbAg não fosse alterada (0,1 mg/mL). Como mencionado anteriormente, em cada amostra foi adicionado o surfactante aniônico SDS nas concentrações que variaram de 0 - 15,0 mmolL⁻¹. O surfactante catiônico CTAC foi adicionado às amostras de HbAg na faixa de concentração entre 0 - 10,0 mmolL⁻¹. As amostras foram preparadas em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹ em dois valores diferentes de pH (5,0 e 7,0).

Inicialmente os espectros foram coletados após 1, 3, 6 e 24 horas do preparo das amostras. Todavia, após 3 horas de equilíbrio os espectros não apresentaram mudanças significativas. Por isso, todos os espectros apresentados nesta dissertação são após 3 horas de equilíbrio, é o tempo ideal para que ocorra a máxima interação.

Em um primeiro momento, as medidas espectroscópicas foram realizadas sem centrifugar as amostras, ou seja, em algumas condições mesmo observando a olho nu a presença de agregados proteína-surfactante em solução, as análises foram realizadas. Em uma segunda, etapa todas as amostras foram centrifugadas antes das medições, a 5.000 rpm (3.000 x g) e a 4º C por 10 minutos. O agregado precipitado HbAg-surfactante foi descartado e com o sobrenadante foram analisadas as medidas espectroscópicas.

Para todas as medidas de absorção ótica, emissão de fluorescência e intensidade de espalhamento de luz no fluorímetro (LSI do inglês "Light scattering intensity") foi utilizada uma cubeta de quartzo, de caminho ótico de 1,0 cm. As medidas de absorção ótica na região UV-vis foram realizadas em um espectrofotômetro modelo UV-1800 SHIMADZU com varredura de 700 – 250 nm.

As medidas de emissão de fluorescência estática foram realizadas em um espectrofluorímetro RF-6000 SHIMADZU. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos com excitação em 295 nm, excitando o Triptofano (Trp), e varredura de emissão na faixa de 305 – 450 nm, com fenda de excitação de 3,0 nm e emissão de 5,0 nm. As medidas de LSI foram realizadas utilizando fendas de excitação e emissão de 3,0 e 5,0 nm, respectivamente, com excitação e emissão no mesmo comprimento de onda de 350 nm. Todas estas análises foram realizadas no Laboratório de Biomoléculas, do Campus de Registro, UNESP.

As medidas de CD foram realizadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) na cidade de Campinas-SP. As amostras para medidas de CD foram preparadas usando HbAg na concentração de 0,1 mg/mL em tampão fosfato 20 mmolL⁻¹, nos valores de pH 5,0 e 7,0. Assim como nas outras medidas espectroscópicas foram adicionados os surfactantes SDS e CTAC, e as amostras foram mantidas nas mesmas condições mencionadas anteriormente, antes de realizar as medidas de CD.

Foi utilizado um espectropolarímetro JASCO J720, na faixa de comprimento de onda da região ultravioleta-visível entre 195 e 260 nm, que corresponde à região das ligações peptídicas. Foi utilizada uma cubeta quartzo de caminho óptico de 1,0 mm e volume de 300 µL. A coleta de dados foi realizada pelo acúmulo de 4 espectros, sendo o espectro final a média desses espectros.

Para analisar os espectros de absorção ótica e de dicroísmo circular, foi utilizado o algoritmo de análise de restrição convexa (do inglês "Convex Constraint Analysis" - CCA), proposto por Perczel et al., 1992. Este software foi aplicado com o intuito de quantificar o número de espécies puras presente em um conjunto de espectros experimentais obtidos após o equilíbrio químico. Desta forma, foi possível obter as espécies puras e contribuição (Fração) das espécies em função da concentração dos surfactantes SDS e CTAC.

3.5 Absorção ótica

É uma técnica muito utilizada para monitorar processos físicos e químicos de moléculas. Durante uma radiação incidente de luz, as moléculas da matéria absorvem uma parte, causando a excitação de elétrons que passam do estado fundamental para níveis de energia mais elevados. As moléculas em solução absorvem energia no tempo de 10⁻¹⁵ segundos, que é considerado um período de tempo curto para acontecer mudanças significativas entre os núcleos atômicos das moléculas (GERACI; PARKHURST, EATON; HOFRICHTER, 1983; SKOOG et al., 2002).

A absorção ótica utiliza a relação entre radiação incidente (luz inicial) e radiação transmitida (luz final) de uma amostra que, geralmente, encontra-se diluída. Tal parâmetro de absorção é regido pela lei de Beer-Lambert. A lei Beer-Lambert

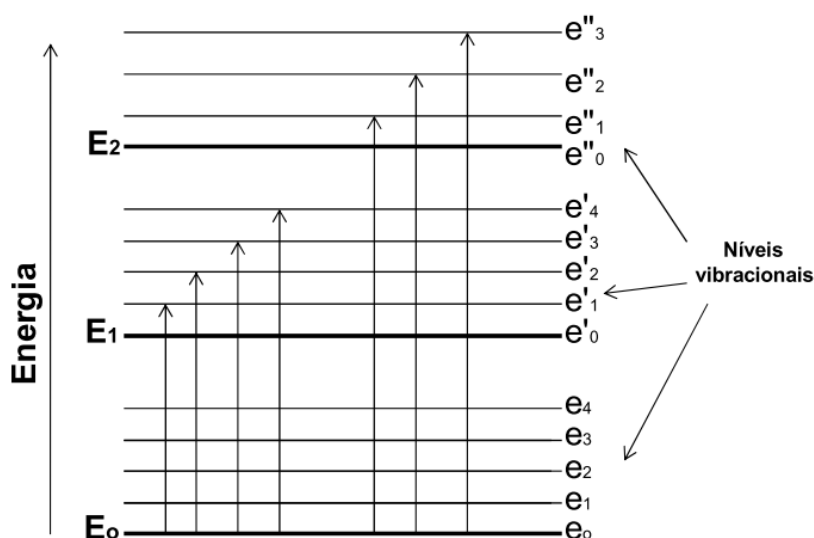
utiliza uma relação de quantidade de luz absorvida e o caminho ótico que apresenta a espessura da amostra em solução. É expressa pela razão I_0 / I , que resulta no valor da fração de luz incidente que é transmitida, transmitância (T), e os dados geralmente são apresentados na forma de absorbância pela seguinte equação:

$$T = I / I_0 \rightarrow A = \log T = (I_0 / I) = \varepsilon \times C \times \ell$$

Onde A é o valor da absorbância, ε corresponde a absorvidade molar, que é característico de cada espécie em um determinado solvente, C é a concentração da amostra e ℓ o caminho ótico da cubeta (EATON; HOFRICHTER, 1983; SKOOG et al., 2002).

Assim, quando uma molécula absorve uma quantidade de energia da radiação, os elétrons vão para níveis de energia mais altos como mostra a Figura 7, a seguir:

Figura 7 - Ilustração do diagrama dos níveis de energia eletrônicos de uma molécula, sendo E_0 o nível de energia do estado fundamental e E_1 e E_2 níveis de dois estados excitados. As linhas e_0, e_1, \dots, e_4 representam os níveis vibracionais de energia da molécula.



Fonte: Skoog et al. (2002).

Os comprimentos de onda dos máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) são um dos parâmetros mais relevantes desta técnica espectroscópica. Os $\lambda_{\text{máx}}$ representam a separação entre os níveis de energia e a largura da banda está relacionada com o ambiente ao redor do cromóforo (heterogeneidade do cromóforo e o movimento molecular). Assim, com esta técnica podemos estudar uma grande variedade de

biomoléculas, dentre elas os grupos moleculares que absorvem energia na região UV-vis.

Dentre as biomoléculas podemos destacar os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, ligações peptídicas, hemoglobinas, etc. Cada aminoácido aromático tem uma maior absorvidade em um comprimento de onda específico na região UV-vis. A fenilalanina absorve mais intensamente em 260 nm, tirosina em 275 nm e o triptofano em 280 nm e as ligações peptídicas entre 190 – 198 nm (EATON; HOFRICHTER, 1983; POLI et al., 2006).

No caso das hemoglobinas estas são monitoradas nos comprimentos de onda entre 700 – 250 nm, pois apresentam bandas características de absorção na região UV-vis, como por exemplo, as bandas em 575 nm e 540 nm denominadas banda Q, e a banda de Soret entre 400 – 415 nm. Todas estas bandas são atribuídas à absorção do anel porfirínico (grupo heme). Desta forma, podemos acompanhar mudanças conformacionais nas estruturas proteicas e o estado de oxidação do ferro do grupo heme (EATON; HOFRICHTER, 1983; POLI et al., 2006).

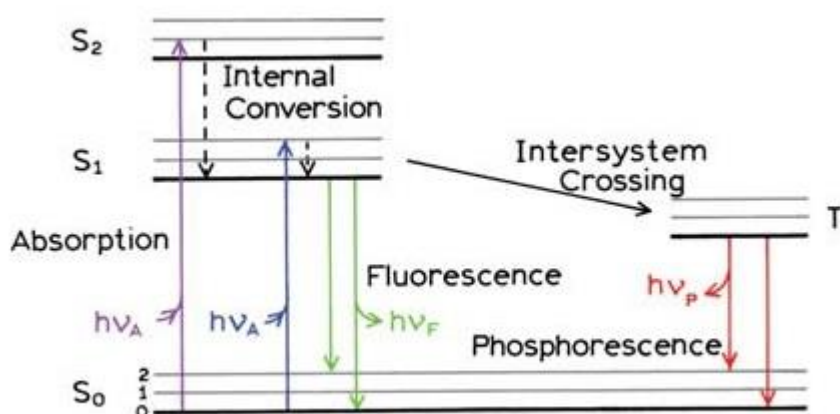
As bandas Q e a banda de Soret ocorrem em função das transições eletrônicas que ocorrem no grupo heme. A banda de Soret, a mais energética e intensa, pode ser atribuída às transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ nos orbitais do anel porfirínico. Enquanto que as bandas Q as transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ de menor energia da porfirina. Todas estas misturadas com as transições $d \rightarrow d^*$ do átomo de ferro (EATON; HOFRICHTER, 1983).

3.6 Emissão de fluorescência

O processo de luminescência molecular é resultante do estado excitado da molécula, podendo ser fluorescência ou fosforescência (Figura 8). Quando ocorre o estado excitado singleto (o spin no elétron no orbital excitado mantém sua orientação original), tem-se a fluorescência. E quando o estado excitado da orientação do elétron é tripleto (invertida), T_n , ocorre à fosforescência (SKOOG et al., 2002). A espectroscopia de fluorescência é utilizada no estudo de biomoléculas com o intuito de obter informações sobre modificações na estrutura tridimensional de uma proteína, tais como processo de desnaturação, dissociação, supressão e interação com pequenas moléculas.

Ao excitar uma molécula por absorção de fótons, seguida por emissão de luz em comprimento de onda maior, ou seja, a energia emitida pelas moléculas na forma de fluorescência é menor que a energia presente no processo de absorção. A molécula no estado excitado possui um tempo de vida relativamente longo de 10^{-9} segundos, sendo que parte da energia absorvida é perdida para o meio, ou a fluorescência é suprimida por fenômenos como movimentos vibracionais, rotacionais, etc. (SKOOG et al., 2002).

Figura 8 - Diagrama de Jablonski. Absorção de radiação ($S_0 \rightarrow S_1$); Emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$); Conversão interna e relaxação vibracional ($S_2 \rightarrow S_0$); Cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$); Emissão de fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0$).



Fonte: Lakowicz (1983).

Apesar de muitas moléculas poderem interagir com a radiação eletromagnética, nem todas são capazes de emitir fluorescência. No caso da diferença de energia entre o primeiro estado Singlete excitado (S_1) e estado fundamental (S_0) não for muito grande, e se ocorrer à possibilidade de sobreposição de níveis vibracionais, a molécula pode ser levada ao estado S_0 por relaxamento vibracional sem a emissão de radiação eletromagnética. Porém, se a diferença energética entre S_1 e S_0 for relativamente grande, irá ocorrer à emissão de radiação na forma de fluorescência durante a desativação para o estado fundamental.

Para uma molécula emitir fluorescência ela precisa ter uma estrutura apropriada e deve estar em um meio que favoreça a desativação radioativa $S_1 \rightarrow S_0$, sendo estes dois fatores críticos na determinação da magnitude da eficiência quântica (ou rendimento quântico) de fluorescência de uma substância. O rendimento quântico de fluorescência de uma substância é a razão entre o número

de fótons emitidos por fluorescência e o número de fótons absorvidos. Quando o rendimento quântico de uma molécula estiver com uma magnitude entre 0,1 - 1,0, ela é significativamente fluorescente (LAKOWICZ, 1983).

A fluorescência das proteínas, em geral, é considerada intrínseca, pois os aminoácidos aromáticos que fazem parte de sua constituição são os responsáveis pela emissão de fluorescência.

Até o momento, acredita-se que a fenilalanina (Phe), a tirosina (Tyr) e o Trp são os aminoácidos aromáticos responsáveis pela fluorescência das proteínas. O Trp é o aminoácido mais monitorado em estudos por fluorescência, devido ao fato de que o Trp pode ser monitorado exclusivamente em 295 nm, pois a Phe e Tyr não absorvem neste comprimento de onda (λ).

Além disso, o Trp é muito sensível ao ambiente ao qual ele está exposto, apresentando diferentes características fluorescentes, em função do grau de exposição ao solvente hidrofílico ou regiões hidrofóbicas da proteína. Vale salientar que o Trp possui um maior rendimento quântico quando comparado com a Phe e Tyr.

As medidas de emissão de fluorescência estática foram realizadas em um espectrofluorímetro RF-6000 SHIMADZU no laboratório de Biomoléculas, no Campus de Registro, UNESP.

3.7 Intensidade de espalhamento de luz

A interação da radiação eletromagnética com a matéria pode produzir vários efeitos: absorção, emissão, transmissão ou espalhamento. O espalhamento de luz ocorre quando o campo elétrico oscilante da radiação incidente num átomo induz oscilações periódicas na sua nuvem eletrônica, passando o mesmo a funcionar como fonte secundária de radiação. O campo elétrico da luz incidente acelera as partículas carregadas, fazendo com que estas emitam radiação com a mesma frequência de onda incidente, e então ocorre o espalhamento de luz.

Vale mencionar que neste espalhamento de luz onde não há perda de energia, as partículas se movimentam majoritariamente na direção perpendicular a sua aceleração, e a radiação emitida será polarizada na direção observada. Assim, as medidas de Intensidade de espalhamento de luz (LSI) foram monitoradas no espectrofluorímetro usando o λ de excitação e o λ de emissão em

350 nm (VAN HOLD, 2006).

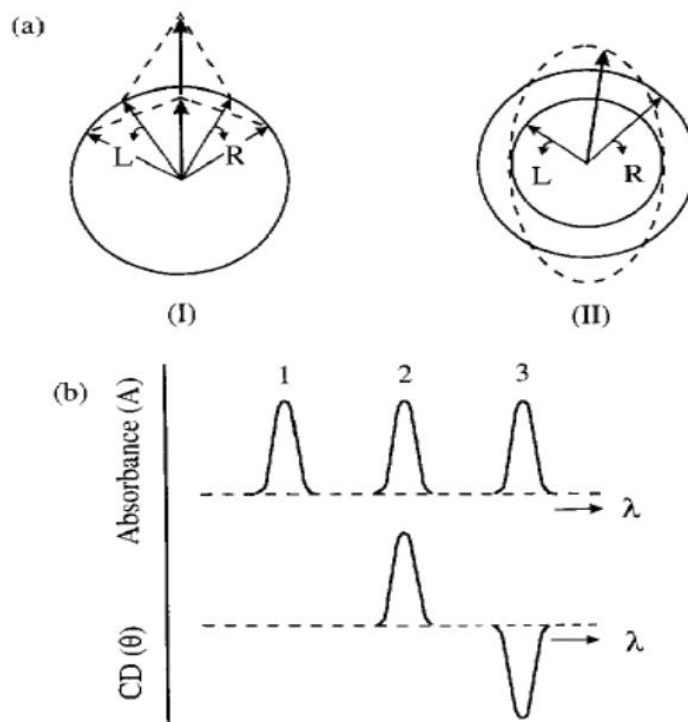
Assim, através da LSI podemos avaliar a interação da HbAg com os ligantes, constatar a formação de agregados ou dissociação da proteína em consequência da adição de surfactante (POLI et al., 2006; SANTIAGO et al., 2007). As medidas de LSI foram realizadas um espectrofluorímetro RF-6000 SHIMADZU no laboratório de Biomoléculas, no Campus Unesp de Registro -SP.

3.8 Medidas de Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular é uma importante ferramenta para estudar mudanças na estrutura de biomoléculas, pois é possível quantificar a estrutura secundária de uma proteína e avaliar mudanças conformacionais ocasionadas por ligantes, agentes desnaturantes e temperatura (KELLY et al., 1997; VAN HOLD et al., 2006).

As medidas de CD foram realizadas excitando uma amostra de interesse com um feixe de luz polarizada circularmente à direita e à esquerda, medindo a diferença de absorção de a radiação polarizada circular à direita (R_r) e à esquerda (L_r). O resultado é obtido por meio da relação entre a diferença ($\Theta = L_r - R_r$) em função do comprimento de onda. É obtido a elipticidade (Θ) em unidades de $\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$, que representa o grau de rotação do campo elétrico da radiação no plano polarizado pelas moléculas. Sensíveis mudanças na estrutura da biomolécula podem causar diferença na absorção à esquerda e a direita, além da distorção do plano de polarização da luz (KELLY et al., 1997), a determinação destes parâmetros na medida está representada na Figura 9.

Figura 9 - Origem do efeito do CD. (a) As componentes circularmente polarizadas à esquerda (L) e à direita (R) de radiação polarizada no plano: (I) as duas componentes têm a mesma amplitude e quando combinadas geram a radiação polarizada no plano. (II) as componentes têm amplitudes diferentes e a resultante círculo tracejado é polarizado elipticamente. (b) A relação entre os espectros de absorção e de CD. A banda 2 tem um espectro de CD, positivo, com $\epsilon_L > \epsilon_R$; a banda 3 tem um espectro de CD negativo com $\epsilon_R > \epsilon_L$; a banda 1 corresponde a um cromóforo aquiral ou não quiral, sinal de CD nulo.



Fonte: Kelly et al. (1997).

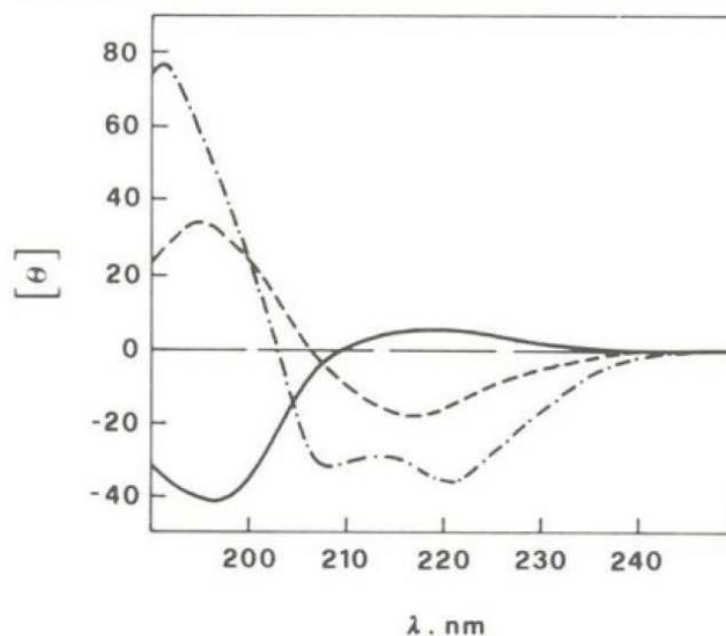
Os cromóforos são as moléculas responsáveis pela absorção em um plano polarizado definido e possuem atividade ótica. É abundante a quantidade de biomoléculas que possuem atividade ótica, e que na maioria é constituída de estruturas complexas, que propicia a presença de um elevado número de centros assimétricos (GERACI; PARKHURST, 1983; VAN HOLD et al., 2006).

Tendo em vista que as proteínas apresentam estrutura primária, secundária, terciária e quaternária, as estruturas primárias são regulares e planares devido às ligações peptídicas rígidas (O=N-C-) possuindo o restante da cadeia com alto grau de liberdade. As orientações dos peptídeos vizinhos limitam estas características, a maior liberdade do restante da cadeia favorece várias interações intramoleculares de hidrogênios (-N-H-) e (-O-H-) e vários arranjos intramoleculares destas ligações de hidrogênio entre o C-O de uma unidade peptídica e o N-H de outras unidades da cadeia polipeptídica (KELLY et al., 1997; VAN HOLD et al., 2006).

A ocorrência natural da maioria dos aminoácidos dos sistemas biológicos é de forma quiral, assim a estrutura secundária formada por essas moléculas tendem a apresentar características quirais. A região de absorção UV do cromóforo peptídico se encontra entre 180 – 240 nm, e possui elétrons não-ligantes nos átomos de O e N e os elétrons π encontram-se nos orbitais dos átomos de O, N e C (KELLY et al., 1997; VAN HOLD et al., 2006).

Existem três tipos de formas estruturais peptídicas encontradas em proteínas, que podem ser as α -hélices, as folhas- β e as estruturas aleatórias. Por meio da medida de CD obtém-se um espectro que é caracterizado por ombros de elipticidade e de intensidade similar em 222 nm (transições $n \rightarrow \pi^*$) e 208 nm (parte das transições $\pi \rightarrow \pi^*$) característicos das α -hélices, um ombro negativo em 215 nm referente às folhas- β e um positivo em 198 nm que é a região de absorção dos aminoácidos. Na Figura 10 são mostrados os espectros CD característicos de proteínas.

Figura 10 - Espectros de CD no UV associados a vários tipos de estrutura: (traço e ponto) α -hélices, (traços) folhas- β e (linha cheia) estruturas aleatórias.



Fonte: Kelly e Price (1997).

3.9 Método CCA

O método CCA é uma decomposição espectral geral baseada no algoritmo simples, onde é calculado um número variável p de função de base f_i (espectros

puros correspondentes a diferentes espécies em solução) e os respectivos coeficientes C_{ij} da combinação linear de funções f_i , para recuperar as funções f_j (espectros experimentais):

$$f_j = \sum_{i=1}^p C_{ij} f_i$$

Três restrições sobre esses coeficientes são feitas: (1) a soma dos coeficientes é a unidade para cada valor de j , $\sum C_{ij} = 1$, onde $j = 1, 2, \dots, N$, e N é o número de funções experimentais (espectros experimentais) na análise. (2) Os coeficientes são todos positivos, $C_{ij} > 0$. (3) Os pontos correspondentes ao C_{ij} correspondem a um algoritmo simples no espaço euclidiano de dimensão p com o volume mínimo. Uma descrição completa e exemplos deste procedimento são apresentados na literatura (PERCZEL et al., 1992).

Em geral, o número de espécies no equilíbrio é mantido como mínimo usando o método CCA, consistente com as espécies experimentais observadas em solução. A decomposição inclui o primeiro e o último espectro experimental como espectros puros na decomposição final, o que pode ser uma fonte de erro se a titulação não estiver completa. É difícil separar uma contribuição para uma espécie distinta com amplitude inferior a cerca de 10% (dada como a fração do espectro total) ou espécies que exibem espectros muito semelhantes (SANTIAGO et al., 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Interação entre a HbAg em pH 5,0 com os surfactantes SDS e CTAC

4.1.1 Medidas de absorção ótica.

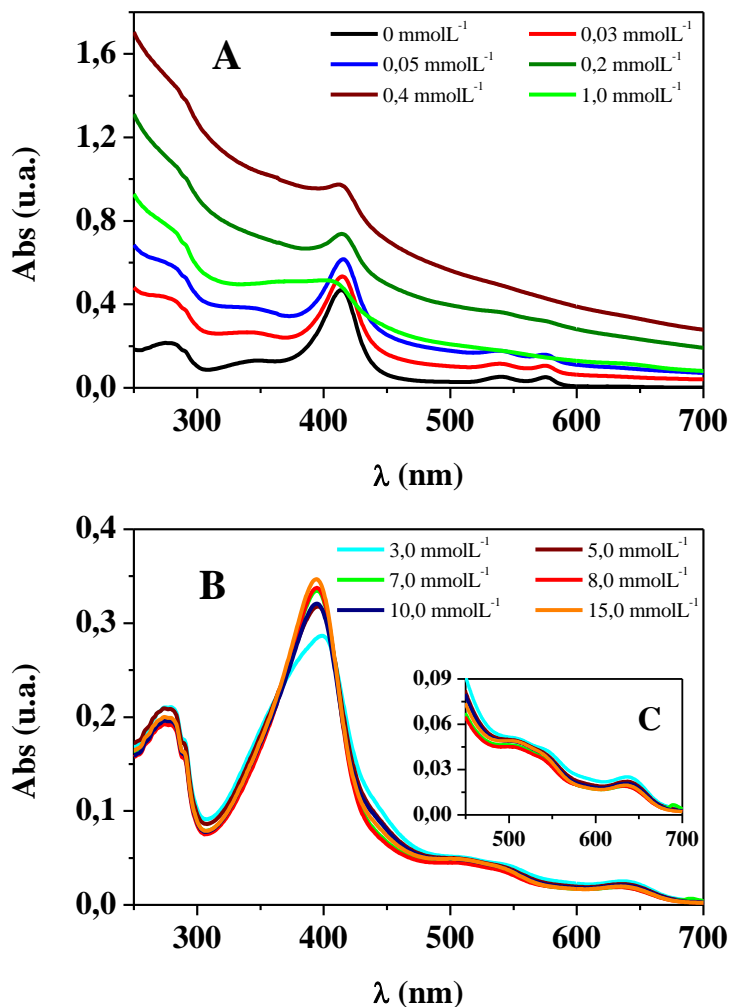
A Figura 11 apresenta os espectros de absorção ótica da HbAg em função da concentração de SDS no pH 5.0. Os espectros de absorção ótica foram divididos em dois grupos, um correspondendo a baixas (na faixa de 0 - 1,0 mmol/L⁻¹, Figura 11A) e altas concentrações de SDS (3,0 – 15,0 mmol/L⁻¹, Figura 11B). O espectro de absorção ótica da HbAg no pH 5,0 na ausência de SDS é caracterizado por uma banda de Soret em 415 nm, e duas Bandas Q em 540 e 575 nm, o que está de acordo com o espectro de absorção de espécies de hemoglobinas na forma oxi- (POLI et al., 2006; SANTIAGO et al., 2007).

Vale mencionar que, espécies oxidadas são caracterizadas por uma banda de Soret em torno de 405-400 nm, uma única banda Q alargada na faixa de 500 - 560 nm, e uma banda de transferência de carga ligante-metal (LMCT) em torno de 610 - 630 nm (POLI et al., 2006; SANTIAGO et al., 2007). As mudanças no espectro de absorção (deslocamento do máximo de absorção da banda de Soret e alargamento das bandas Q) são muito utilizadas para verificar se a hemoproteína se encontra na forma reduzida (Fe²⁺) ou oxidada (Fe³⁺), além de possibilitar o monitoramento da cinética de oxidação da hemoproteína (POLI et al., 2006; SANTIAGO et al., 2007).

Na faixa de concentração de 0,03 á 1,0 mmol/L de SDS observou-se um aumento da intensidade de absorção em 700, 490 e 300 decorrente do aumento do espalhamento de luz de Rayleigh (VAN HOLD, 2006) devido a formação de um complexo de HbAg-SDS que sedimenta (que podemos chamar de espécie agregada de HbAg-SDS). Estas medidas foram realizadas sem centrifugar as amostras.

Após a concentração de 3,0 mmol/L⁻¹ de SDS, o agregado HbAg-SDS foi ressolubilizado e foi observado a formação da espécie com a banda de Soret em 395 nm e uma banda Q alargada em 515 nm, além da banda em 645 nm. Com o intuito de obtermos um espectro de absorção sem a interferência do espalhamento de luz, todas estas amostras foram centrifugadas e novas medidas de absorção ótica foram acumuladas dos sobrenadantes.

Figura 11 - Espectros de absorção óptica da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de SDS, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmolL^{-1} , pH 5,0. Na faixa de concentração de SDS de (A) 0 á $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ e (B) $3,0$ á $15,0 \text{ mmolL}^{-1}$. (C) Inseto da Figura 11B mostrando a região das bandas Q ampliadas. Estas medidas foram realizadas sem centrifugar as amostras.



Fonte: Autor.

Na Figura 12 A, 12B, 12C e 12D são apresentados os espectros de absorção da HbAg em função da concentração de SDS, no pH 5,0, após a centrifugação das amostras. Na faixa de $0,01$ á $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS é observado uma diminuição da intensidade de absorção, um deslocamento do máximo da banda de Soret para comprimento de onda (λ), o que é característica de espécies oxidadas (POLI et al., 2006; SANTIAGO et al., 2007).

Esta diminuição na intensidade de absorção se deve a formação de agregados proteína-surfactante, que após centrifugação ficaram no precipitado. Em

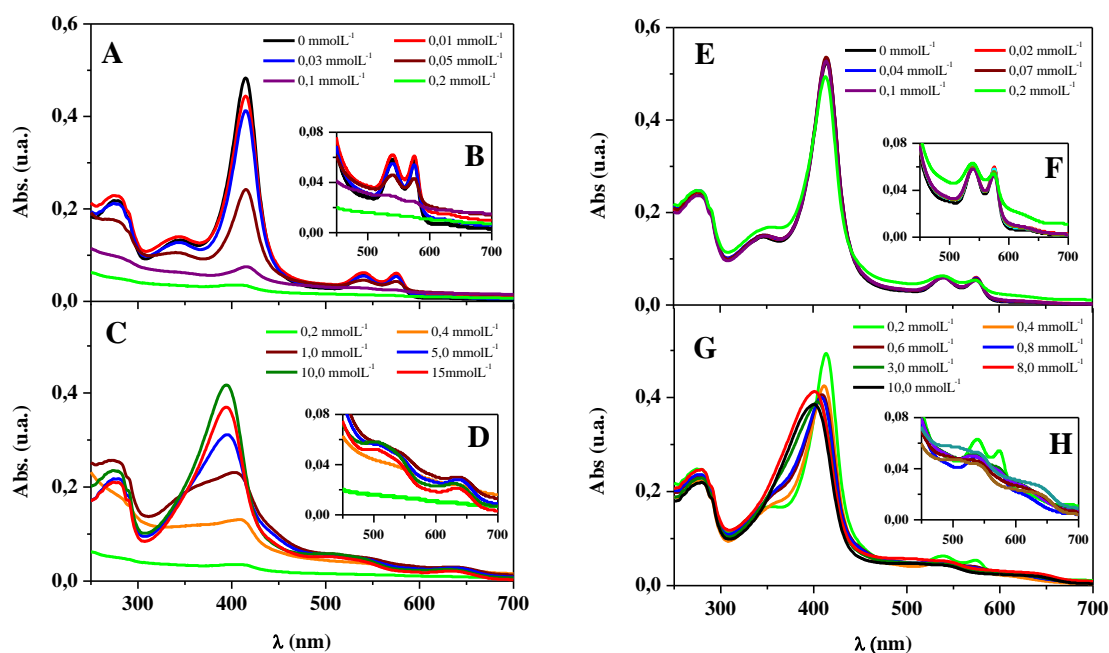
concentrações acima de $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS há um aumento da intensidade de absorção na região da Banda de Soret, devido a ressolubilização dos agregados proteína-surfactante (Figura 12C). Aumentando a presença de complexo HbAg-SDS na solução. Além disso, é observado um deslocamento para λ menor, de 415 para 394 nm, para todas as concentrações de SDS no intervalo de $0,2 - 15,0 \text{ mmolL}^{-1}$ (Figura 12C), e o surgimento de uma banda por volta de 635 nm (Figura 12D).

Estes resultados mostram uma banda alargada característica de espécies aquometa em 500 nm, comumente encontrada em espécies de hemoglobina oxidadas (Figura 12D). Estas mudanças espectrais indicam que a HbAg é oxidada na presença de SDS e que em baixas concentrações de surfactantes aniônicos temos a formação de agregados de proteína-surfactante, provavelmente devido uma forte interação eletrostática entre proteína-surfactante (LIU et al., 2007; SANTIAGO et al., 2010).

A comparação dos dados obtidos na Figura 11 com os apresentados na Figura 12 mostra que antes de centrifugar as amostras (Figura 11) temos um aumento da absorção em 360, 610 e 700 nm devido ao aumento do espalhamento de luz decorrente da presença dos agregados proteína-surfactante.

A forte interação da HbAg com o SDS em pH 5,0 está relacionada com o ponto isoelétrico (pI) de $6,0 \pm 0,3$ da HbAg. O valor do pI foi estimado por nosso grupo de pesquisa em um trabalho que está em fase final de elaboração, e está de acordo com os observados para a HbGp (SANTIAGO et al., 2010). Abaixo do pI , ou seja, pH 5,0, as cargas negativas (-) do SDS poderiam neutralizar os vários sítios catiônicos (+) da proteína (forma-se agregados que precipitam), diminuindo a solubilidade do par iônico surfactante aniônico e os sítios catiônicos da proteína (MOREIRA et al., 2006; POLI et al., 2006; LIU et al., 2007; SANTIAGO et al., 2007).

Figura 12 - Espectros de absorção óptica da HbAg (0,1 mg/mL), em função da concentração de surfactantes iônicos, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmolL⁻¹, pH 5,0. (A) HbAg em função da concentração de SDS, na faixa de 0 á 0,2 mmolL⁻¹; (C) HbAg em função da concentração de SDS, na faixa de 0,2 á 15,0 mmolL⁻¹; (B e D) Insertos das Figuras 12A e 12C, respectivamente, mostrando a região das bandas Q ampliadas. (E) HbAg em função da concentração de CTAC, na faixa de 0 á 0,2 mmolL⁻¹; (G) HbAg em função da concentração de CTAC, na faixa de 0,2 á 10,0 mmolL⁻¹; (F e H) Insertos das Figuras 12E e 12G, respectivamente, mostrando a região das bandas Q ampliadas. Todos os espectros foram obtidos após a centrifugação das amostras.



Fonte: Autor.

Os espectros de absorção óptica resultante da interação da HbAg com o surfactante catiônico CTAC em pH 5,0 são apresentados nas Figuras 12E, 12F, 12G e 12H. A interação da HbAg com o CTAC (surfactante catiônico) no pH 5,0 não apresentou a formação de agregados, por isso os espectros de absorção óptica do sistema HbAg x CTAC no pH 5,0 sem centrifugar (dados não mostrados) são similares aos adquiridos após o processo de centrifugação.

Na faixa de concentração de CTAC entre 0,01 - 0,2 mmolL⁻¹ não foi observada significativa alterações nas bandas de Soret e Q (Figuras 12E e 12F). Acima de 0,2 mmolL⁻¹ de CTAC já é possível observar alterações no espectro de absorção, de modo que com 0,4 mmolL⁻¹ de CTAC, observa-se uma redução da intensidade de absorção da banda de Soret com um pequeno deslocamento para λ

menores e o alargamento das bandas Q em 500 nm, sugerindo a ocorrência do processo de oxidação da hemoglobina.

A faixa de concentração de $1,0 - 10,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC é caracterizada pela presença de espécies oxidadas da HbAg com uma banda alargada, característica de espécies oxidadas em 500 nm. Assim como uma banda LMCT em torno de 645 nm (Figura 12H), um maior deslocamento da banda de Soret para λ menores e o desaparecimento da banda em 345 nm (Figura 12G). O desaparecimento da banda em 345 nm pode ser decorrente da formação de vários tipos de espécies oxidadas, o que alargaria a banda de Soret mascarando a banda em 345 nm.

Como mencionado anteriormente não houve a formação de agregados neste sistema HbAg-CTAC em pH 5,0 em consequência do surfactante CTAC ser catiônico e neste valor de pH prevalecer as cargas positivas na superfície da proteína devido ao valor do pI da HbAg ser por volta de $6,0 \pm 0,3$. Deste modo foi necessária uma maior concentração de CTAC para que fosse possível observar grandes mudanças nos espectros de absorção.

Na Figura 13 são apresentados os valores de intensidade de absorbância em determinados λ em função da concentração de SDS (Figura 13A, 13B, 13C, 13D, 13E, 13F e 13G) e um gráfico de $\lambda_{\text{máx}}$ (comprimento de onda máximo) de absorção em função da concentração de SDS, pH 5.0 (Figura 13H). Lembrando que esta análise é feita com base nos espectros obtidos das amostras após a centrifugação (Figura 12).

Na Figura 13A é apresentado a intensidade da absorção em 415 nm em função da concentração de SDS, pH 5,0. Observa-se que para concentração de SDS $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ ocorre uma grande diminuição da intensidade de absorção. Esta diminuição pode estar associada à formação de agregados proteína-surfactante, como apresentado por Santiago e colaboradores nos estudos com a HbGp na presença de surfactante iônicos (SANTIAGO et al, 2007 e 2010). Pois, ao centrifugar as amostras todos os agregados sedimentados foram eliminados, e o espectro obtido foi o da proteína-surfactante que ainda estava solubilizado em tampão.

Assim, considerando que para uma concentração de proteína de $0,1 \text{ mg/mL}$, o que corresponde a uma concentração de $5 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$ em relação a quantidade de heme, nesta concentração crítica de $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS, tem-se uma razão SDS/HbAg igual a 40.

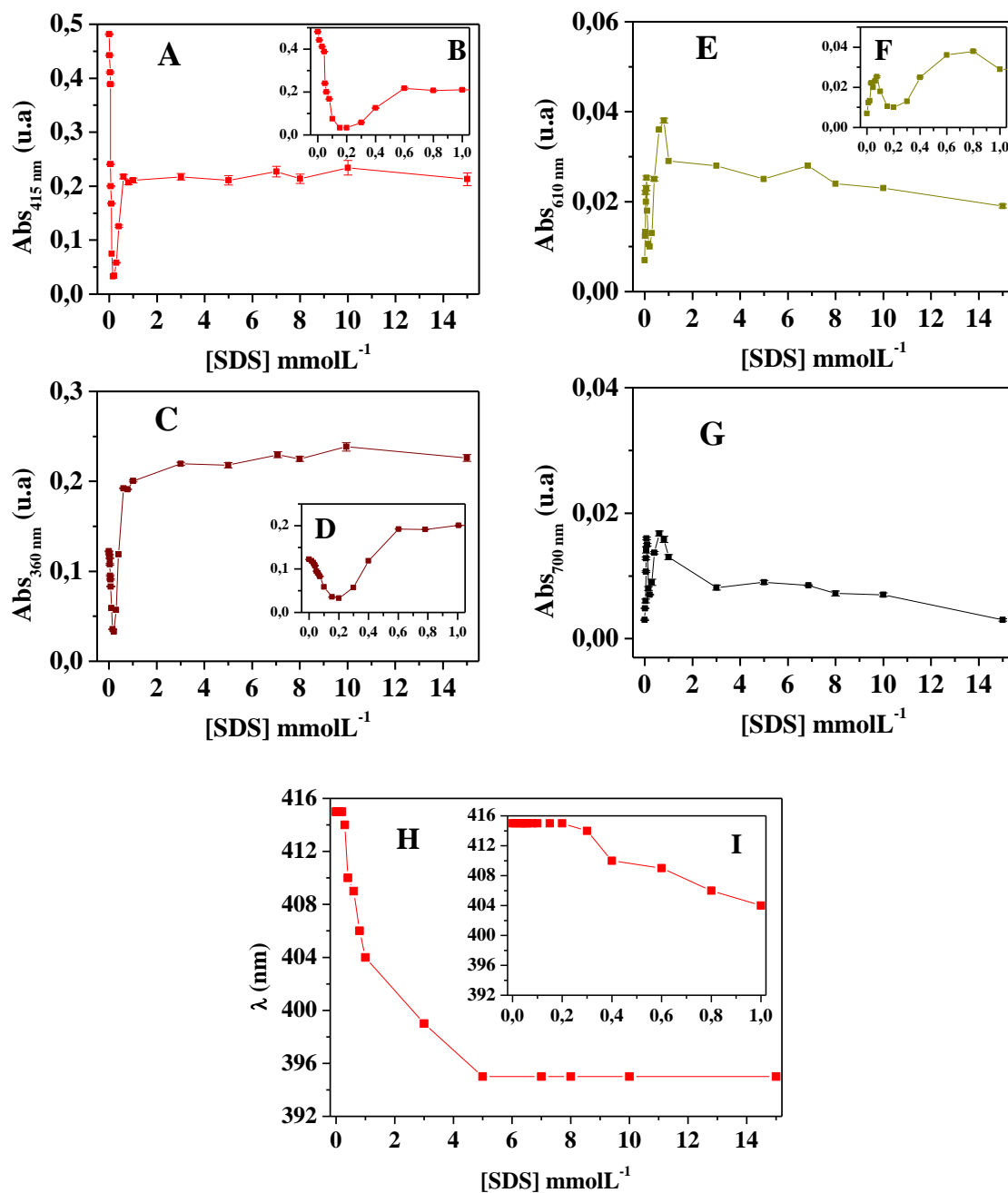
Acima de $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ os agregados de proteína-SDS se ressolubilizam aumentando a intensidade de absorção em 415 nm. A Figura 13C mostra que a intensidade de absorção em 360 nm inicialmente diminui com a adição de SDS, e após a concentração de $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ a intensidade de absorção aumenta. Para a concentração de $0,5 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS a intensidade de absorção permanece constante. Em 610 nm observa-se um ligeiro aumento da intensidade de absorção e após a concentração de $0,6 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS a intensidade de absorção permanece constante.

Na Figura 13G não foi observado um aumento significativo da intensidade de absorção em 700 nm, pois as amostras foram centrifugadas e desta forma a contribuição do espalhamento de luz foi amenizada. A alta intensidade de espalhamento em 700 nm pode estar associada à agregação da proteína, visto que as hemoglobinas não apresentam bandas de absorção características neste comprimento de onda (SANTIAGO et al., 2007).

Nas Figuras 13H e 13I observa-se que o SDS, no pH 5,0 não causou mudanças no $\lambda_{\text{máx.}}$ de absorção da banda de Soret em concentrações inferiores a $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$, porém a partir desta concentração ocorre um deslocamento do $\lambda_{\text{máx.}}$ de forma gradual até atingir o λ de 394 nm com $5,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de surfactante e a partir daí permanece constante.

Estes resultados podem indicar que a adição de SDS no pH 5,0 pode induzir o processo de agregação de proteína-surfactante em concentrações de $0,01 - 0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ e que em concentrações de SDS acima da faixa de agregação ocorre a oxidação da proteína (BOFFI et al., 1999).

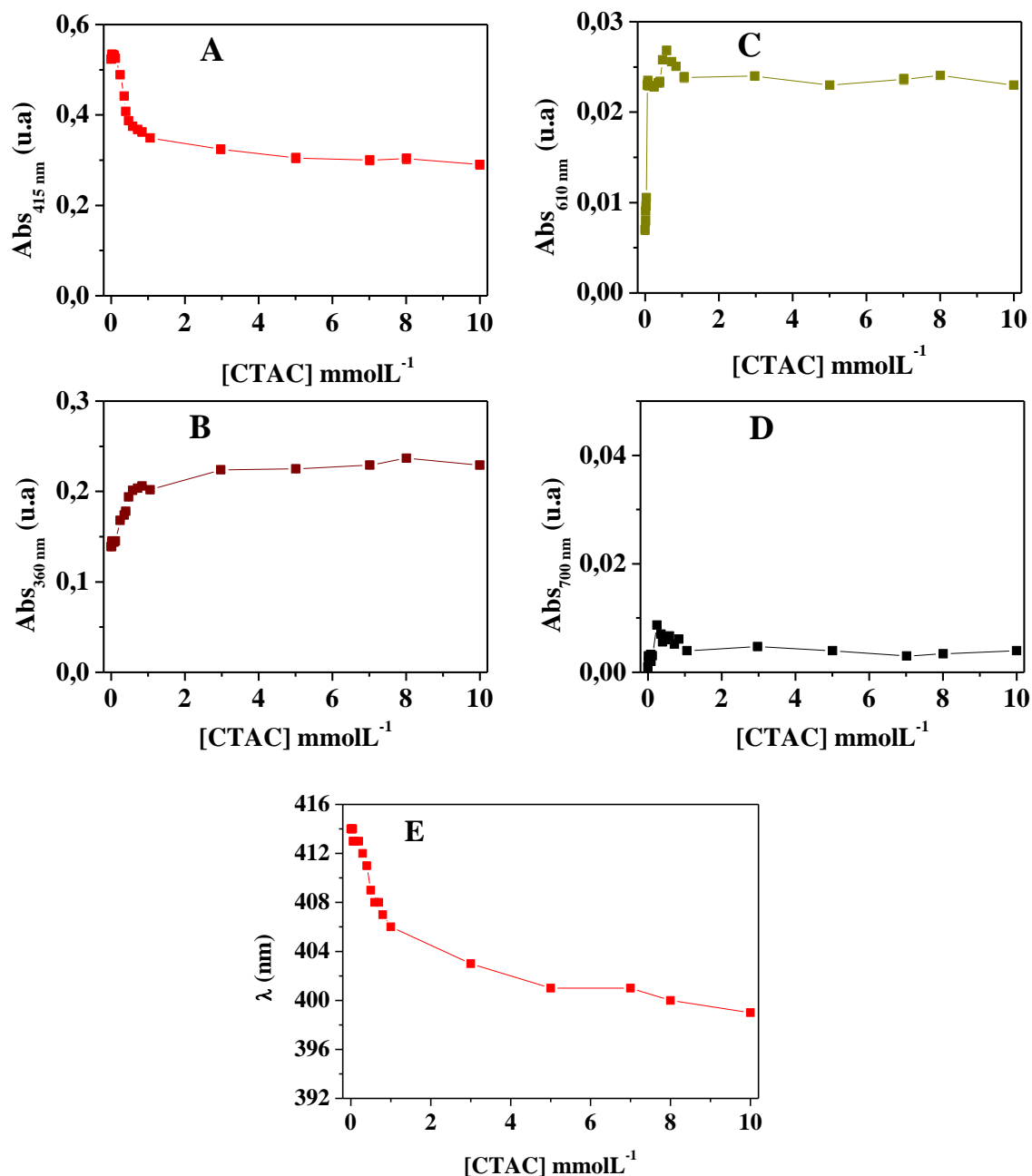
Figura 13 - (A) Absorbância em 415 nm; (B) Inserto da Figura 13A; (C) Absorbância em 360 nm; (D) inserto Figura 13C; (E) Absorbância em 610 nm; (F) inserto da Figura 13E; (G) Absorbância em 700 nm e (H) Comprimento de onda máximo (λ_{\max}) da banda de Soret em função da concentração de SDS, pH 5,0; (I) Inserto da Figura 13H. Estes resultados são decorrentes dos apresentados nas Figuras 12A e 12C da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de SDS, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹, pH 5,0.



Fonte: Autor.

A Figura 14A mostra a intensidade de absorção em 415 nm da HbAg em função da concentração de CTAC no pH 5,0, onde foi observado uma diminuição gradual da absorção. Após a concentração de $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, a intensidade de absorção permanece constante até atingir a concentração máxima de $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$. As Figuras 14B e 14C mostram que o aumento da concentração de CTAC aumenta a intensidade de absorção nos λ de 360 e 610 nm, evidenciando a oxidação da HbAg (POLI et al., 2006; SANTIAGO et al., 2007). A intensidade de absorção em 700 nm mantém-se praticamente constante por toda faixa de concentração de CTAC estudada (Figura 14D). A Figura 14E mostra que o λ_{max} de absorção da banda de Soret na ausência de CTAC é de 414 nm e que ao adicionar CTAC ocorre um deslocamento para o azul da banda de Soret. A partir de 3 mmolL^{-1} de CTAC o λ_{max} manteve-se constante em 400 nm.

Figura 14 - (A) Absorbância em 415 nm; (B) Absorbância em 360 nm; (C) Absorbância em 610 nm; (D) Absorbância em 700 nm e (E) Comprimento de onda máximo (λ_{\max}) da banda de Soret em função da concentração de CTAC, pH 5,0; Estes resultados são decorrentes dos apresentados nas Figuras 12E e 12G da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de CTAC, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹, pH 5,0.



Fonte: Autor.

O conjunto de espectros apresentados na Figura 12 foram analisados pelo método de CCA, com o intuito de quantificar e separar (decompor) as espécies presentes em solução. Dessa forma, três espécies distintas foram obtidas na presença de SDS no pH 5,0 (Figura 15A). A espécie 1 corresponde a HbAg na sua forma nativa ou forma oxi-HbAg, a espécie 2 é relacionada ao complexo HbAg-SDS

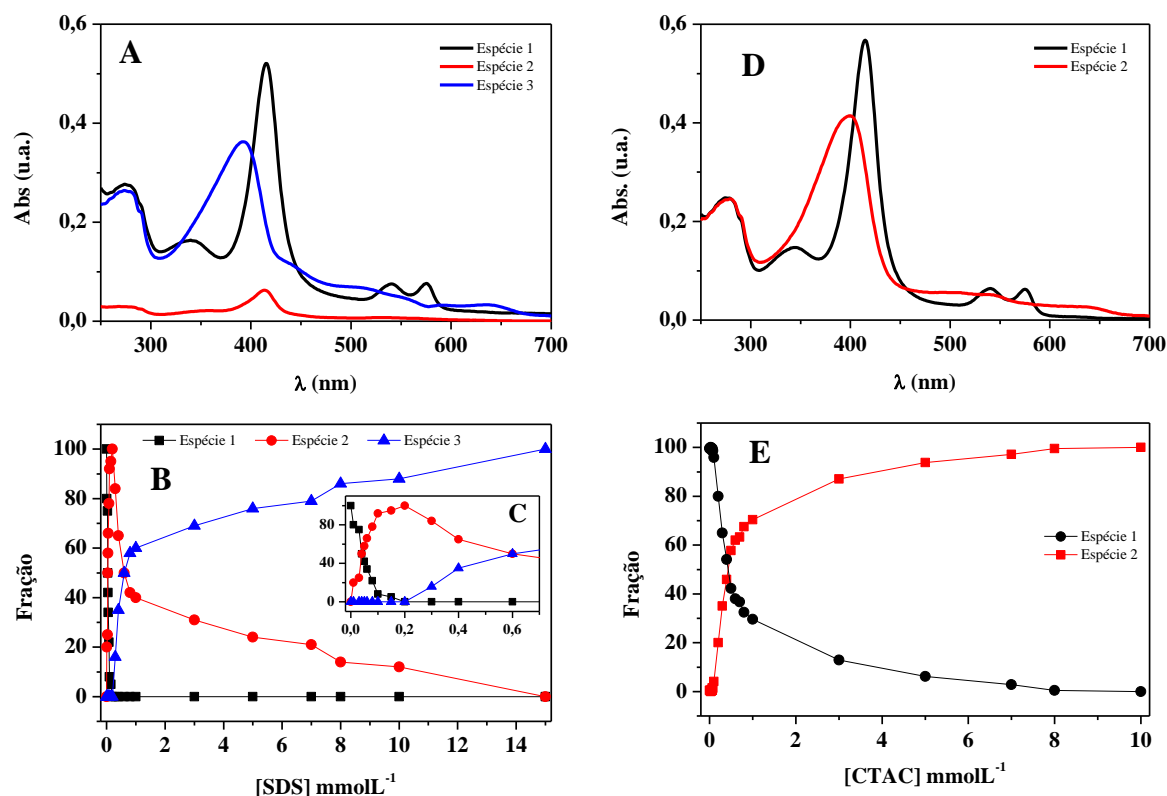
que permaneceu solubilizado em solução (enquanto uma grande parte de HbAg-SDS se agrega, e é retirado da solução por centrifugação) e a espécie 2 ao complexo HbAg-SDS ressolubilizado. Esta espécie 3, que surge em altas concentrações de SDS pode ser associada a subunidades da HbAg decorrentes do processo de dissociação da HbAg na presença de altas concentrações de SDS.

Na presença de CTAC ocorre a presença de duas espécies em solução (Figura 15D). A espécie 1 corresponde a HbAg na forma oxi-HbAg e a espécie 2 referente a HbAg oxidada e dissociada na presença de altas concentrações de CTAC.

O método CCA informa também as frações de cada espécie presente em solução, em função da concentração de ambos os surfactantes (Figuras 15B e 15E). Na presença de $0,04 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS ocorre a formação de 50% da espécie 2, e entre as concentrações de $0,04$ e $0,6 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS, temos uma faixa de concentração de SDS que favorece a formação de agregados de HbAg-SDS. Acima de $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC não foi observado mudanças significativas nos espectros de absorção, e a partir desta concentração apenas a espécie 2 está presente em solução.

Vale salientar que a dissociação oligomérica da HbAg, devido a presença de altas concentrações de surfactantes, pode promover a formação de uma maior quantidade de espécies oxidadas. Ao dissociar-se a proteína expõe o grupo heme as moléculas de água, enquanto que na forma nativa, o grupo heme fica protegido pelo bolsão hidrofóbico. Este fato pode ocasionar uma maior taxa de auto-oxidação levando à formação de várias espécies oxidadas no meio (BOFFI et al., 1999).

Figura 15 - Análises dos espectros de absorção óptica apresentados na Figura 12 pelo método CCA (PERCZEL et al., 1992). (A) Espectros de absorção óptica das espécies obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de SDS, pH 5,0; (B) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [SDS] pH 5,0; (C) Inseto da Figura 15B; (D) Espectros de absorção óptica das espécies obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de CTAC, pH 5,0; (E) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [CTAC] pH 5,0.



Fonte: Autor.

4.1.2 Emissão de fluorescência

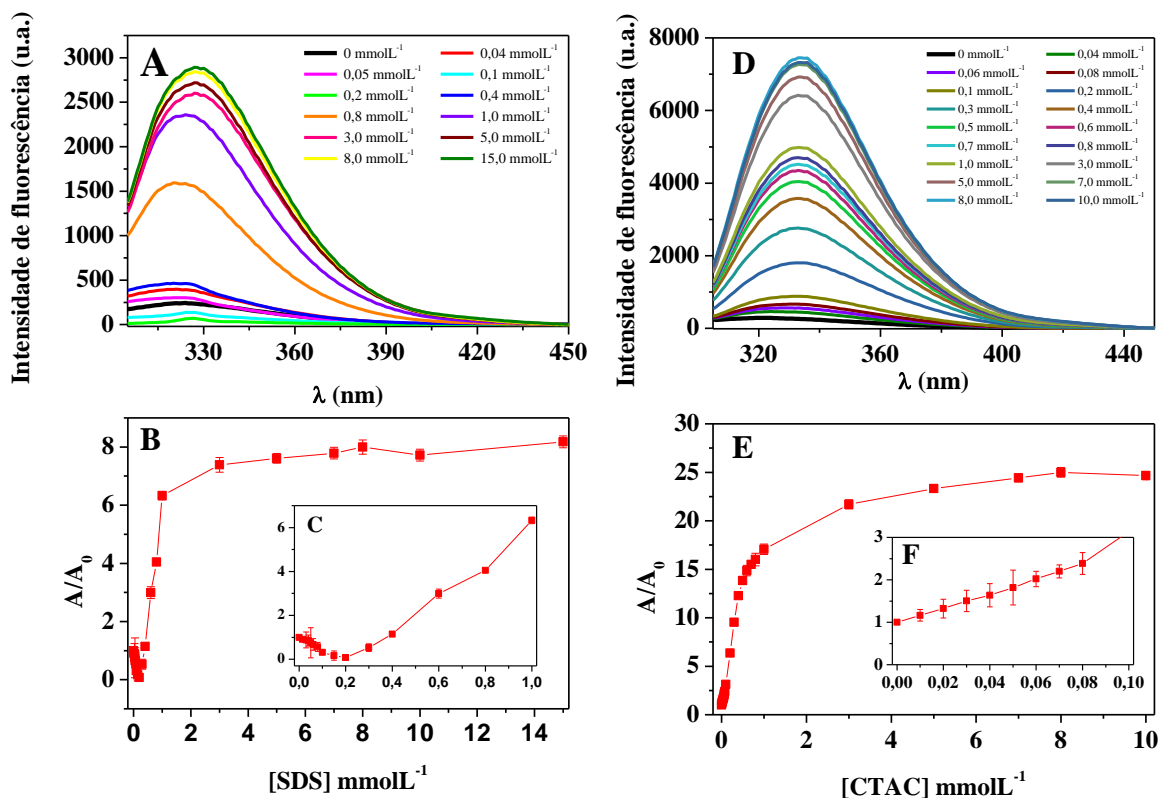
A emissão de fluorescência da HbAg é decorrente dos aminoácidos aromáticos, porém este estudo foi monitorado apenas o triptofano (Trp), excitando as amostras em 295 nm. Todavia, observa-se uma maior supressão de fluorescência dos Trp quanto mais próximos estes estiverem dos grupos hemes da HbAg (HIRSCH et al., 1994). Assim, se um aumento na distância relativa entre os grupos hemes e os resíduos de Trp acontecer, além da maior acessibilidade dos Trp aos solventes, um aumento na emissão de fluorescência e um deslocamento do máximo de emissão poderá ser observado. Por isso, processos de dissociação de hemoglobinas, como a HbLt e HbGp, podem ser monitorados por fluorescência (HIRSCH et al., 1994; SANTIAGO et al., 2007; MOREIRA et al., 2008).

Os espectros de emissão de fluorescência para os sistemas HbAg-SDS e HbAg-CTAC, ambos em pH 5,0, são apresentados respectivamente, nas Figuras 16A e 16D. Enquanto que a fluorescência total normalizada para estes sistemas está apresentada nas Figuras 16B e 16E.

Na Figura 16A pode-se observar um deslocamento no comprimento de onda máximo de emissão ao adicionar concentrações crescentes de SDS na HbAg, pH 5,0, que pode estar relacionado com a presença de diferentes acessibilidades de Trp com o meio. Além disso, observa-se que ao adicionar SDS, inicialmente, a intensidade de fluorescência diminuiu e após a concentração de $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS um aumento gradual da emissão de fluorescência é observado (Figuras 16B e 16C). Ao analisar o gráfico da área de fluorescência total normalizada pela área de emissão da HbAg na presença de surfactante no pH 5,0 (Figuras 16B e 16C) observa-se um aumento da emissão de um fator de aproximadamente 8, em relação a HbAg pura.

Diferente do que ocorre com os resultados da área total de fluorescência normalizada da HbAg, pH 5,0, na presença de SDS, ao adicionar concentrações crescente de CTAC ocorre um aumento da emissão fluorescência de forma gradual (Figuras 16D e 16E). O espectro de emissão da HbAg na presença de CTAC, pH 5,0, aumentou um fator de 23 vezes em relação a HbAg na ausência de surfactante. Esta fato está relacionado com a exposição dos resíduos de Trp do bolsão do heme ficarem expostos ao solvente em função da dissociação da proteína.

Figura 16 - Espectros de emissão de fluorescência da HbAg, pH 5,0, em função da concentração de (A) SDS e (D) CTAC; (B) Área total de emissão de fluorescência da HbAg normalizada pela emissão da HbAg na presença de SDS; (C) inserto da Figura 16B; (E) Área total de emissão de fluorescência da HbAg normalizada pela emissão da HbAg na presença de CTAC; (F) inserto da Figura 16E. As amostras de HbAg ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) foram preparadas em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L^{-1} nos valores de pH 5,0.



Fonte: Autor.

4.1.3 Medidas de LSI

As medidas de LSI foram realizadas para monitorar o processo de agregação envolvendo a HbAg com a presença dos surfactantes SDS e CTAC.

É importante mencionar que as amostras utilizadas para as análises de LSI foram preparadas nas mesmas condições das utilizadas para as medidas de absorção óptica e emissão de fluorescência, e que as medidas de LSI foram realizadas após a centrifugação das amostras.

Na Figura 17A são apresentados os dados de LSI do sistema HbAg-SDS no pH 5,0. Por meio do inserto da Figura 17A, é possível observar que a HbAg na ausência de surfactante apresenta um alto valor de LSI devido ao fato dela se encontrar na forma íntegra. De acordo com a literatura esta classe de hemoglobina apresenta um diâmetro hidrodinâmico próximo de 30 nm quando se encontra na

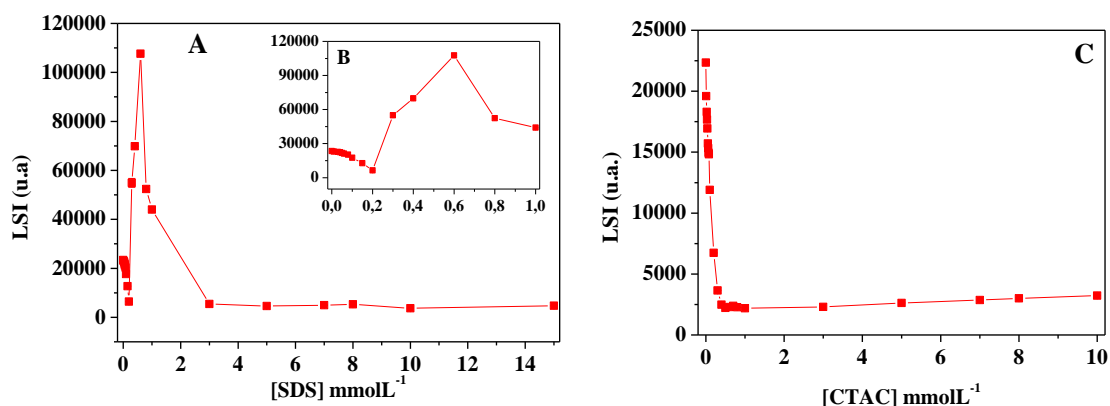
forma nativa e a 25°C (SANTIAGO et al., 2010; CARVALHO J et al., 2013). Ao adicionar pequenas concentrações de surfactante (abaixo de 0,2 mmolL⁻¹) de SDS observa-se que a LSI diminuiu. Na faixa de concentração de 0,2 á 1,0 mmolL⁻¹ de SDS a intensidade de espalhamento de luz aumenta um fator de aproximadamente 5 quando comparada com o valor de LSI na HbAg nativa. Após 1 mmolL⁻¹ de SDS a LSI diminui drasticamente, e para concentrações acima de 3 mmolL⁻¹ de SDS o valor de LSI é menor do que o valor dela integra (Figuras 17A e 17B).

Estes dados podem significar que para o sistema HbAg-SDS, pH 5,0, em baixas concentrações de SDS a proteína inicialmente sofre dissociação, e que em concentrações intermediárias de SDS (0,2 – 1,0 mmolL⁻¹) tem-se a máxima intensidade de espalhamento, devido a formação de espécies agregadas, que mesmo após o processo de centrifugação podem estar presentes em solução. Em altas concentrações de SDS a proteína encontra-se totalmente dissociada em subunidades menores e solúveis em solução.

Estes resultados corroboram com os dados de emissão de fluorescência normalizada para o mesmo sistema (Figura 16A) sugerindo que o processo de dissociação da HbAg devido a presença de SDS, aumenta a intensidade de emissão de fluorescência e reduzindo a LSI. Na Figura 17C observa que o valor de LSI da HbAg pH 5,0 diminuiu drasticamente quando se adiciona concentrações crescentes de CTAC.

Estes dados corroboram com os apresentados por absorção ótica e fluorescência, onde ficou evidente, que neste sistema não ocorre a formação de espécies agregadas de proteína-surfactante devido a repulsão eletrostática do CTAC com a carga positiva da HbAg. Acima de 0,5 mmolL⁻¹ de CTAC o valor de LSI é cerca de 5 vezes menor do que da HbAg na forma integra. Santiago et al. (2010), mostraram por meio de estudos da HbGp de intensidade de espalhamento de luz, que o CTAC, em valores de pH 5,0 e 6,0 induz a dissociação da HbGp em pequenas subunidades, sem a formação de agregados e precipitação da proteína.

Figura 17 - Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg (0,1 mg/mL), em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹ em pH 5,0, em função da concentração de SDS (A), (B) inserto da Figura 17A, e em função da concentração de CTAC (C).



Fonte: Autor.

4.1.4 Medidas de CD

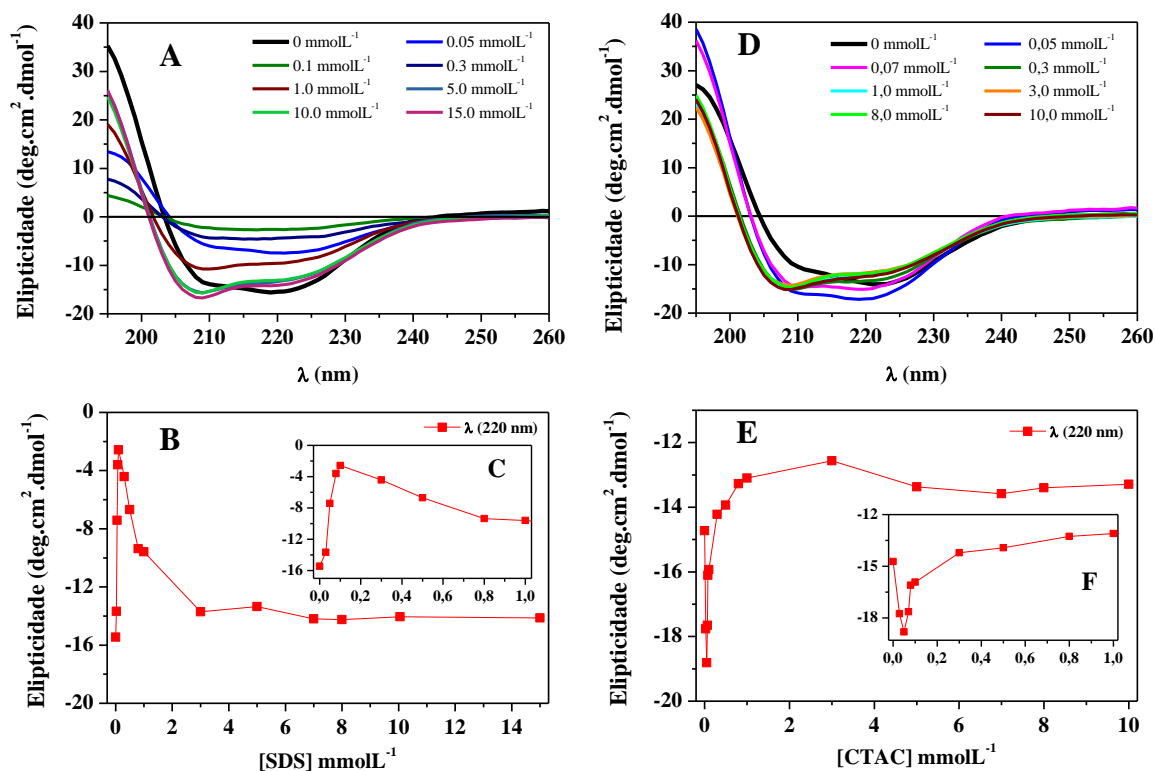
De acordo com os dados da literatura os espectros de dicroísmo circular para hemoglobinas caracterizam-se por uma banda positiva próxima a 198 nm e duas bandas negativas próximas a 208 e 220 nm atribuídas às ligações peptídicas e estruturas α -hélice, respectivamente (POLI et al., 2006; SANTIAGO et al., 2007; MOREIRA et al., 2008). Os dados de CD para o sistema HbAg-SDS no pH 5,0 (Figuras 18A e 18B) demonstram que ocorre uma gradual perda da estrutura secundária da HbAg com a adição de SDS até atingir 0,1 mmolL⁻¹, diminuindo o valor de elipticidade. Acima de 0,1 mmolL⁻¹ de SDS o valor de elipticidade começa a aumentar e ao atingir a concentração de 2,0 mmolL⁻¹ de surfactante tende a se manter estável sofrendo pequenas oscilações.

Este comportamento está de acordo com a modificação gradual dos espectros UV-vis e de emissão de fluorescência para este mesmo valor de pH apresentados anteriormente. Porém vale dizer que para a concentração de 0,1 mmolL⁻¹ de SDS o valor de elipticidade em 220 nm não atinge zero, ou seja, o processo de desnaturação da proteína não é completo.

Os dados de CD para o sistema HbAg-CTAC em pH 5,0 (Figuras 18D e 18E) mostram um pequeno aumento de elipticidade em 220 nm com a adição de baixas concentrações de CTAC, que é seguido por uma perda de elipticidade com o incremento do surfactante até atingir a concentração máxima de 10,0 mmolL⁻¹. Porém vale dizer que, mesmo para altas concentrações de CTAC, 10 mmolL⁻¹ o

valor da elipticidade não fica nulo, evidenciando que não ocorre a perda total da estrutura secundária da HbAg.

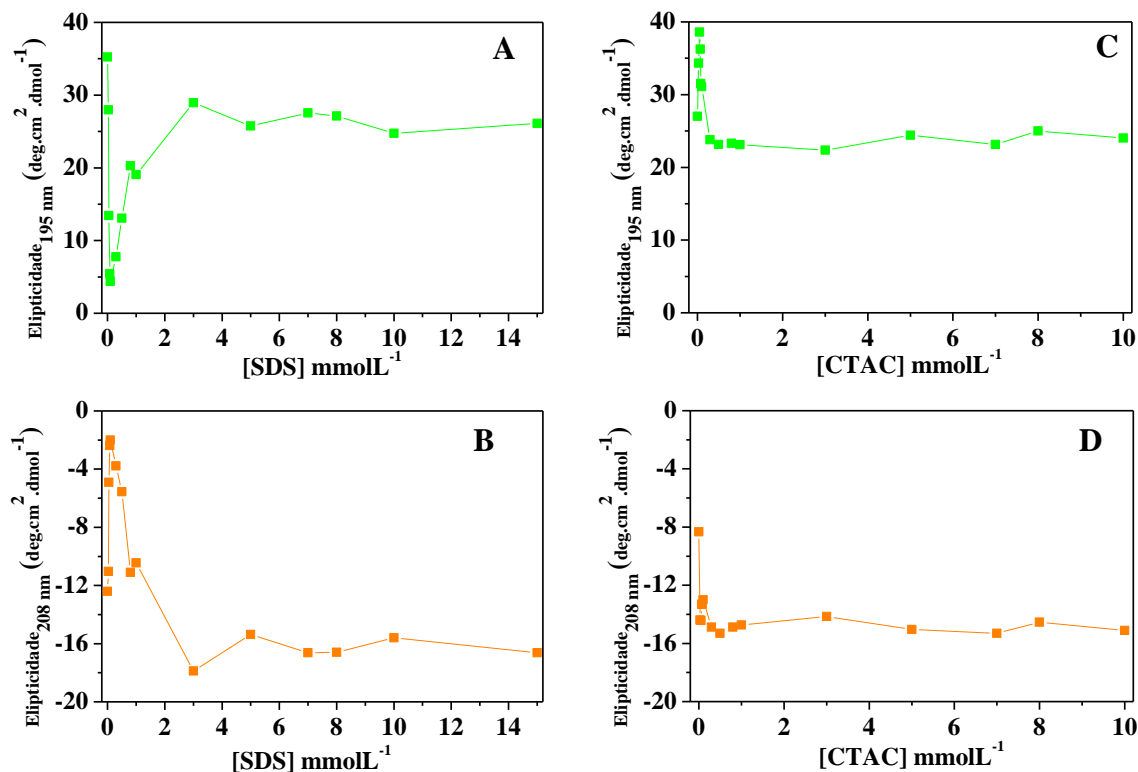
Figura 18 - Espectro de dicroísmo circular (CD) para HbAg (0,1 mg/mL), em tampão fosfato 20 mmolL⁻¹ pH 5,0, em função da concentração de SDS (A), e em função da concentração de CTAC (D); Valores de Elipticidade em 220 nm em função da concentração de SDS (B), e em função da concentração de CTAC (E). (C e F) Inserdos das Figuras 18B e 18E.



Fonte: Autor.

O SDS inicialmente diminui o valor da elipticidade na banda em 195 nm, referente aos aminoácidos (Figura 19A), paralelamente ocorre a redução das α -hélices em 208 nm, até atingir a concentração de 0,1 mmolL⁻¹. O CTAC provocou mudanças de forma paralela entre a elipticidade em 195 nm (banda dos aminoácidos) e 220 nm (α -hélices) (Figura 20E), onde ambas as bandas sofrem um ligeiro aumento até atingir a concentração de 0,05 mmolL⁻¹, e em concentrações superiores diminuem, permanecendo constante e menos intensa que na ausência de CTAC.

Figura 19 - Elipticidade da HbAg em 195 nm em função da concentração de SDS, pH 5,0 (A), e em função da concentração de CTAC, pH 5,0 (C); Elipticidade em 208 nm em função da concentração de SDS, pH 5,0 (B), e em função da concentração de CTAC, pH 5,0 (D). Estes dados foram obtidos dos espectros apresentados na Figura 18.



Fonte: Autor.

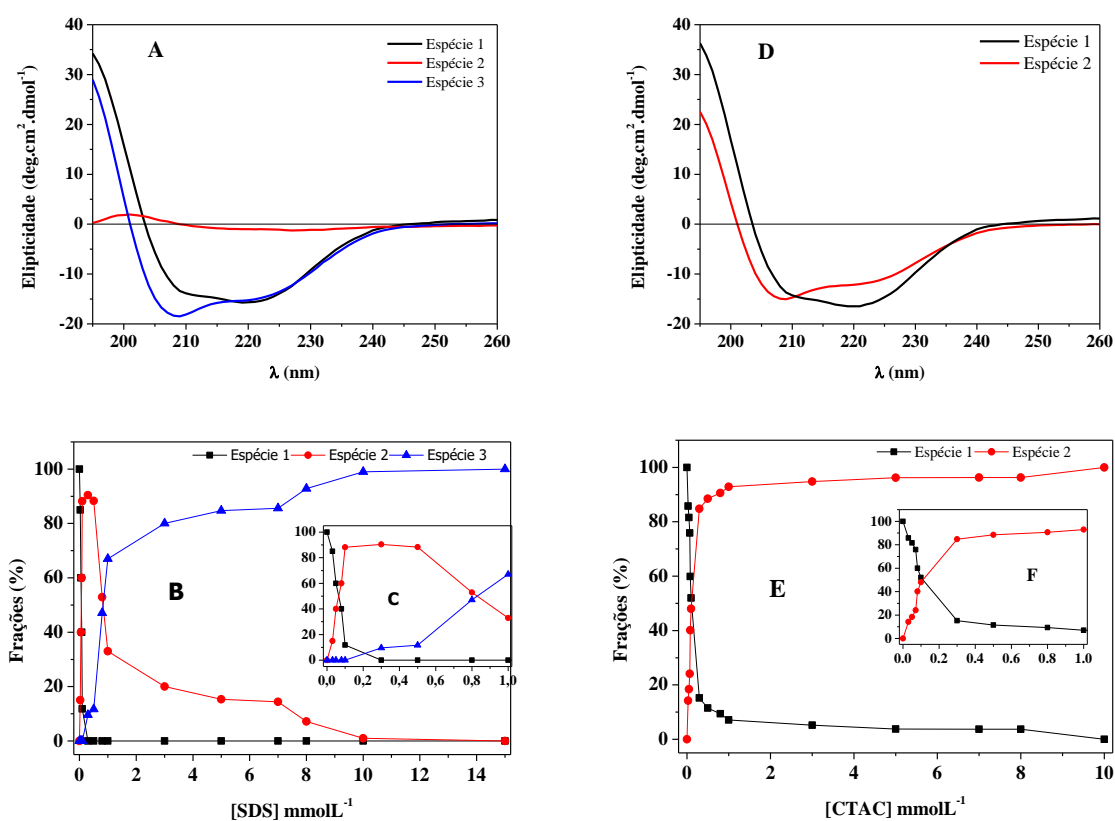
Os espectros das medidas de CD da HbAg na presença dos surfactantes SDS e CTAC foram analisados pelo método CCA, assim como os espectros das medidas de absorção ótica. Os espectros de CD da HbAg na presença de SDS apresentaram três espécies puras em solução e com a presença de CTAC apresentou duas espécies em solução (Figuras 20A e 20D).

De acordo com método CCA referente aos espectros das medidas de CD, temos as frações de cada espécie presente em solução, em função da concentração de ambos os surfactantes (Figuras 20B e 20E). Na presença de 0,06 mmolL⁻¹ de SDS ocorre a formação de 50% da espécie 2, e entre as concentrações de 0,1 e 0,3 mmolL⁻¹ de SDS, temos uma faixa de concentração crítica de SDS que favorece a maior perda da estrutura secundária, faixa onde ocorre a formação de agregados de HbAg-SDS.

Acima de 0,3 mmolL⁻¹ ocorre a ressolubilização dos agregados, levando a redução da espécie 2 na solução. Próximo de 0,8 mmolL⁻¹ ocorre a formação de

50% da espécie 3 que prevalece com o aumento da concentração de SDS. Na presença de CTAC ocorre a formação de 50% da espécie 2 com 0,1 mmolL⁻¹ de surfactante em pH 5,0 (Figuras 20E e 20F). Acima de 1,0 mmolL⁻¹ de CTAC a espécie 2 prevalece.

Figura 20 - Análises dos espectros de CD apresentados na Figura 18 pelo método CCA (PERCZEL et al., 1992). (A) Espectros de CD das espécies puras obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de SDS, pH 5,0; (B) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [SDS] pH 5,0; (C) Inserto da Figura 20B; (D) Espectros de CD das espécies puras obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de CTAC, pH 5,0; (E) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [CTAC] pH 5,0; (F) Inserto da Figura 20E.



Fonte: Autor.

Os resultados apresentados para a interação entre a HbAg e o surfactante aniônico SDS, no valor de pH 5,0, indicam que o SDS em baixas concentrações (até 0,2 mmolL⁻¹) foi capaz de induzir o processo de oxidação da hemoproteína e a formação de agregados. A literatura reporta que a interação de SDS com Hb em baixa concentração pode resultar no aumento do potencial redox de meta-Hb e a degradação do heme (MOOSAVI-MOVAHEDI et al., 2003; SALEHI et al., 2014).

Estas propostas estão de acordo com os resultados das técnicas espectroscópicas utilizadas neste trabalho. Na Figura 18A ocorre a perda de α -hélice é intensa nas concentrações iniciais de SDS ($0,01 - 1,0 \text{ mmolL}^{-1}$), indicando que, provavelmente, ocorre uma forte interação eletrostática entre a HbAg e o SDS, no pH 5,0, considerando o *pI* dessa hemoproteína.

Os espectros de emissão de fluorescência para a titulação da HbAg, pH 5,0, com o surfactante SDS (Figuras 16A e 16D) indica que em baixas concentrações de surfactante a intensidade de fluorescência diminui, devido a formação de agregados de HbAg-SDS, e que em altas concentrações de SDS a intensidade de fluorescência aumento consideravelmente devido a dissociação da proteína.

Assim, o mecanismo de desenovelamento deve expor o interior hidrofóbico, de modo que aumenta a interação com os surfactantes e favorecendo o processo de dissociação. A existência de duas fases apresentadas nos dados experimentais pode estar relacionada com a intensa interação eletrostática com SDS e uma fraca interação eletrostática com o CTAC, no pH 5,0.

Segundo Gebicka e Gebicki (1999), a interação eletrostática é importante para determinar mudanças na estrutura secundária da proteína, pois a geometria da parte hidrocarbonada da molécula de surfactante influencia significativamente as interações do surfactante com o grupo heme, em estudos envolvendo a interação do citocromo *c* com SDS. De fato, os surfactantes induzem uma redução do conteúdo alfa-hélice, sendo este efeito menor para surfactantes catiônicos em relação aos aniônicos, em valores de pH ácido (TOFANI et al., 2004).

4.2 Interação entre a HbAg em pH 7,0 com os surfactantes SDS e CTAC

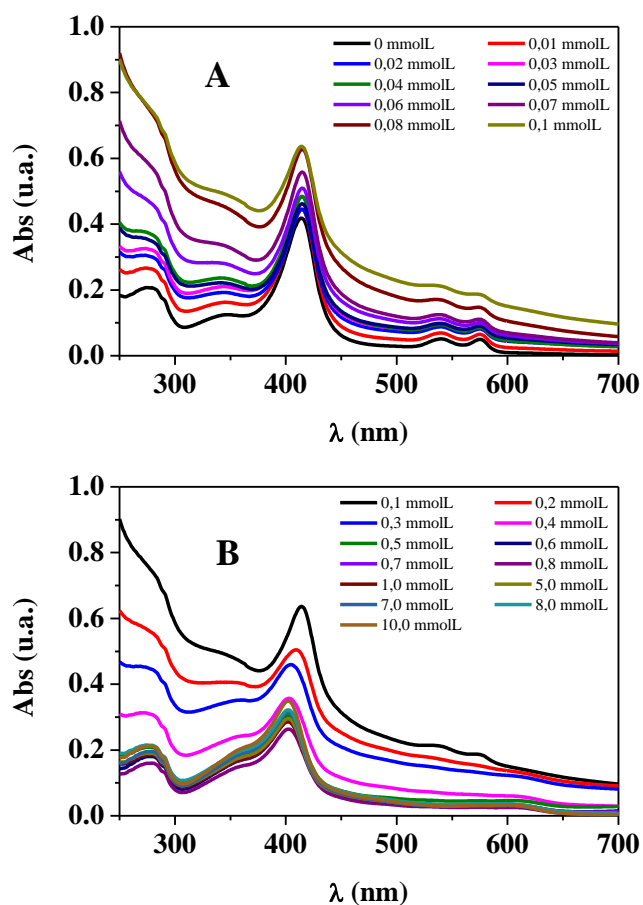
4.2.1 Medidas de absorção ótica

A seguir são apresentados nas Figuras 21A e 21B os espectros de absorção ótica resultante da interação da HbAg-CTAC em pH 7,0, sem centrifugar as amostras. Em decorrência da forte interação entre a hemoproteína, que se encontra com carga predominantemente negativa, e o surfactante catiônico CTAC ocorreu a formação de agregados. Estes agregados acabam resultando no aumento da intensidade de espalhamento de luz em toda faixa espectral 250 – 700 nm. O agregado proteína-surfactante sedimenta e para a faixa de concentração de CTAC de 0,03 – 0,3 mmolL⁻¹ tem-se a máxima contribuição desta espécie.

Este fenômeno de agregação deve estar relacionado com a forte interação eletrostática da HbAg em pH 7,0, ou seja, pH acima do ponto isoelétrico desta classe de proteínas, com surfactantes catiônicos que apresentam cargas opostas ao da proteína.

Como pode ser observado nos espectros de absorção da HbAg na faixa de concentração de 0,03 á 0,3 mmolL⁻¹ de CTAC um aumento da intensidade de absorção em 700, 490 e 360 nm são decorrentes da formação de agregados HbAg-CTAC que sedimentam-se. Com o objetivo de excluir a contribuição do espalhamento de luz nos espectros de absorção, todas as amostras foram centrifugadas com o intuito de deixar a solução homogênea.

Figura 21 - (A e B) Espectros de absorção óptica da HbAg (0,1 mg/mL), em função da concentração de CTAC, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmolL^{-1} , pH 7,0. Os espectros foram coletados após 3 horas de equilíbrio e sem centrifugação prévia.



Fonte: Autor.

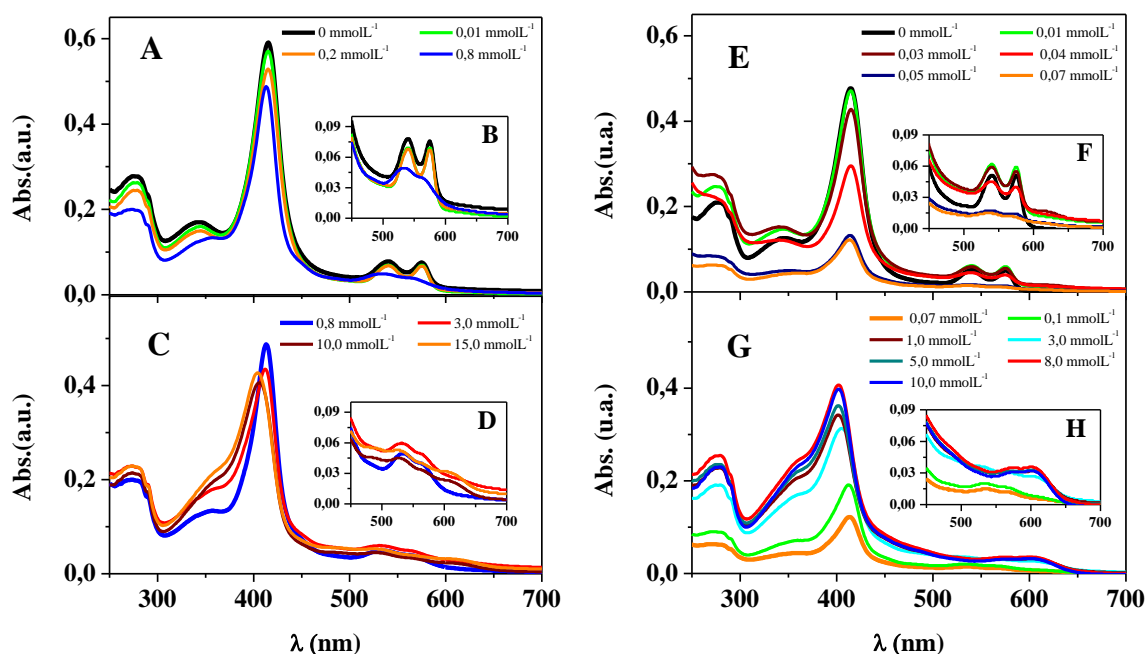
Os espectros de absorção óptica do sistema HbAg-SDS em pH 7,0 (Figura 22A), mostram que em baixas concentrações de SDS ($0 - 0,2 \text{ mmolL}^{-1}$) não ocorreu mudanças significativas nos espectros de absorção. A partir da concentração $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ de surfactante iniciou-se a formação de uma única banda Q centrada em torno de 540 nm e, após a concentração de $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$ (Figura 22A), ocorre simultaneamente o deslocamento da banda de Soret para comprimentos de onda menores e a banda alargada em 540 nm. Acima de $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS a hemoglobina se oxida completamente dando origem a uma banda Q com picos largas próximos a 535 e 565 nm e uma banda LMCT em 610 nm (Figura 22D).

Os espectros de absorção óptica do sistema HbAg-CTAC em pH 7,0 apontam para uma intensa interação entre proteína-surfactante em baixas concentrações de CTAC, ocorrendo um alargamento dos espectros e uma grande redução da absorção da banda de Soret 415 nm (Figura 22E) e a formação de uma única banda

Q (Figura 22F) entre a faixa de concentração de $0,01 - 0,07 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC. Este resultado é similar ao que ocorreu no sistema HbAg-SDS no pH 5,0 ocorrendo a formação de precipitados resultantes da forte interação eletrostática proteína-surfactante.

Todavia, vale salientar que uma menor concentração de CTAC em relação ao do SDS para a mesma concentração de hemoglobina, em valores de pH 7,0 e 5,0, respectivamente, foram necessárias. Acima de $0,07 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC a banda de Soret gradualmente aumenta de intensidade deslocando para λ menores e surge um ombro por volta de 360 nm e uma banda em 610 nm, mantendo-se com estas características até atingir a concentração de $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC (Figuras 22G e 22H).

Figura 22 - (A e C) Espectros de absorção óptica da HbAg ($0,1 \text{ mg/mL}$), em função da concentração de SDS, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmolL^{-1} , pH 7,0; (B e D) Insetos das Figuras 22A e 22C mostrando a região das bandas Q ampliadas. (E e G) Espectros de absorção óptica da HbAg ($0,1 \text{ mg/mL}$), em função da concentração de CTAC, em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmolL^{-1} , pH 7,0; (F e H) Insetos das Figuras 22E e 22G mostrando a região das bandas Q ampliadas.



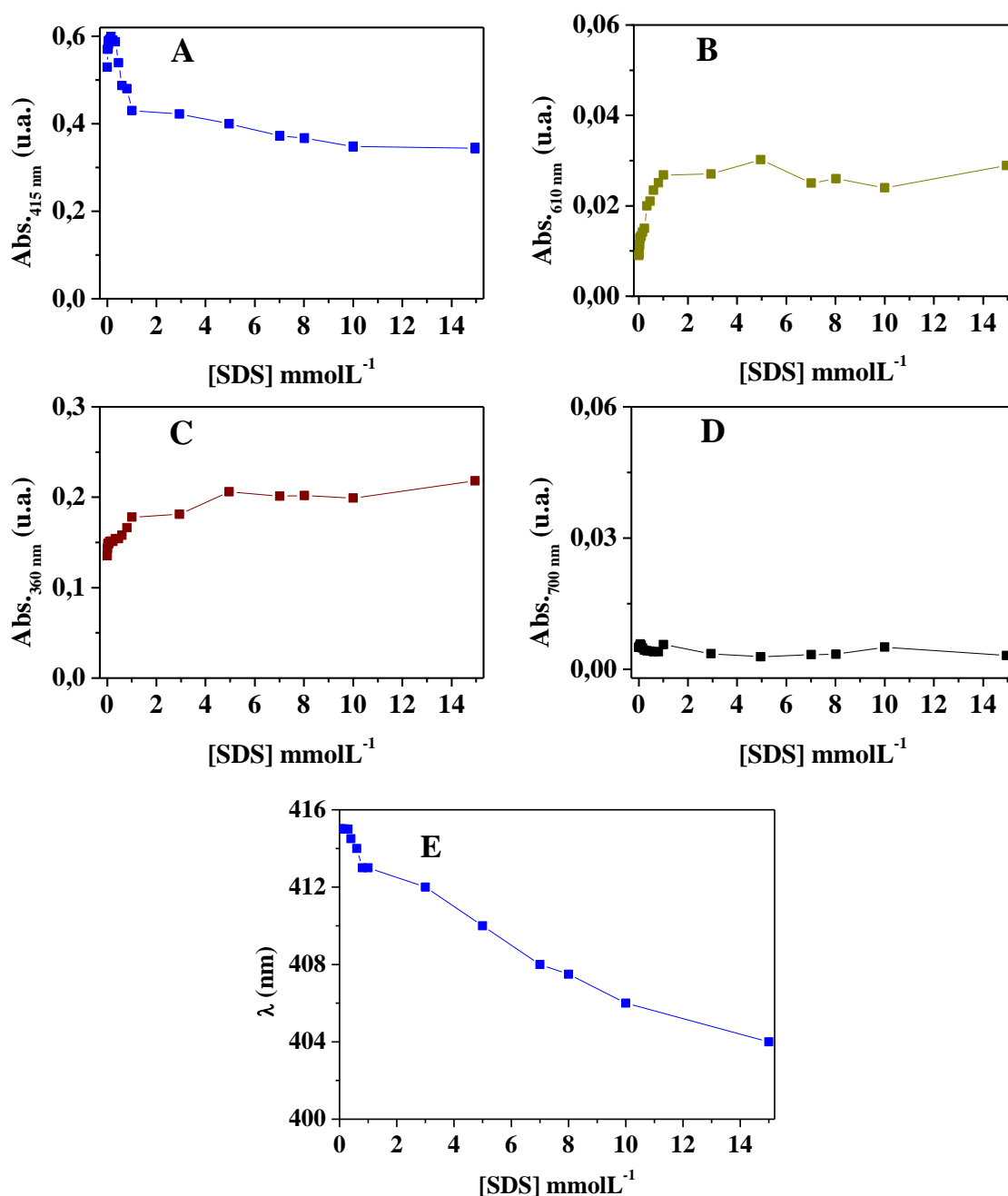
Fonte: Autor.

Na Figura 23A é apresentado a intensidade da absorbância em 415 nm da HbAg, em função da concentração de SDS em pH 7,0. Esta figura mostra que uma concentração superior a $0,4 \text{ mmolL}^{-1}$ de surfactante promove uma redução na intensidade de absorção. Todavia para o sistema HbAg x SDS no pH 5,0, na faixa de concentração de $0,04 - 0,2 \text{ mmolL}^{-1}$, ocorre uma intensa redução da intensidade de absorção, ou seja, cerca de 10 vezes menos de concentração de surfactante quando comparada com o pH 7,0.

Estes resultados são similares aos da HbGp na presença de SDS no valor de pH 7,0 (SANTIAGO et al., 2007). A Figura 23B, referente a absorção em 610 nm (banda LMCT), indica a formação de espécies oxidadas, com a adição do surfactante ocorre um aumento significativo na intensidade de absorção decorrente da interação das cargas da superfície da proteína com o SDS.

O SDS no pH 7,0 causou o deslocamento no $\lambda_{\text{máx}}$ da banda de Soret em baixas concentrações (Figura 23E), o deslocamento ocorre de forma gradual até atingir o λ de 404 nm com $15,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de surfactante, não obtendo um platô como no pH 5,0.

Figura 23 - (A) Absorbância em 415 nm; (B) Absorbância em 610 nm; (C) Absorbância em 360 nm; (D) Absorbância em 700 nm e (E) Comprimento de onda máximo (λ_{\max}) da banda de Soret em função da concentração de SDS, pH 7,0. Estes resultados são decorrentes dos apresentados nas Figura 22A e 22C da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de SDS, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL^{-1} , pH 7,0.



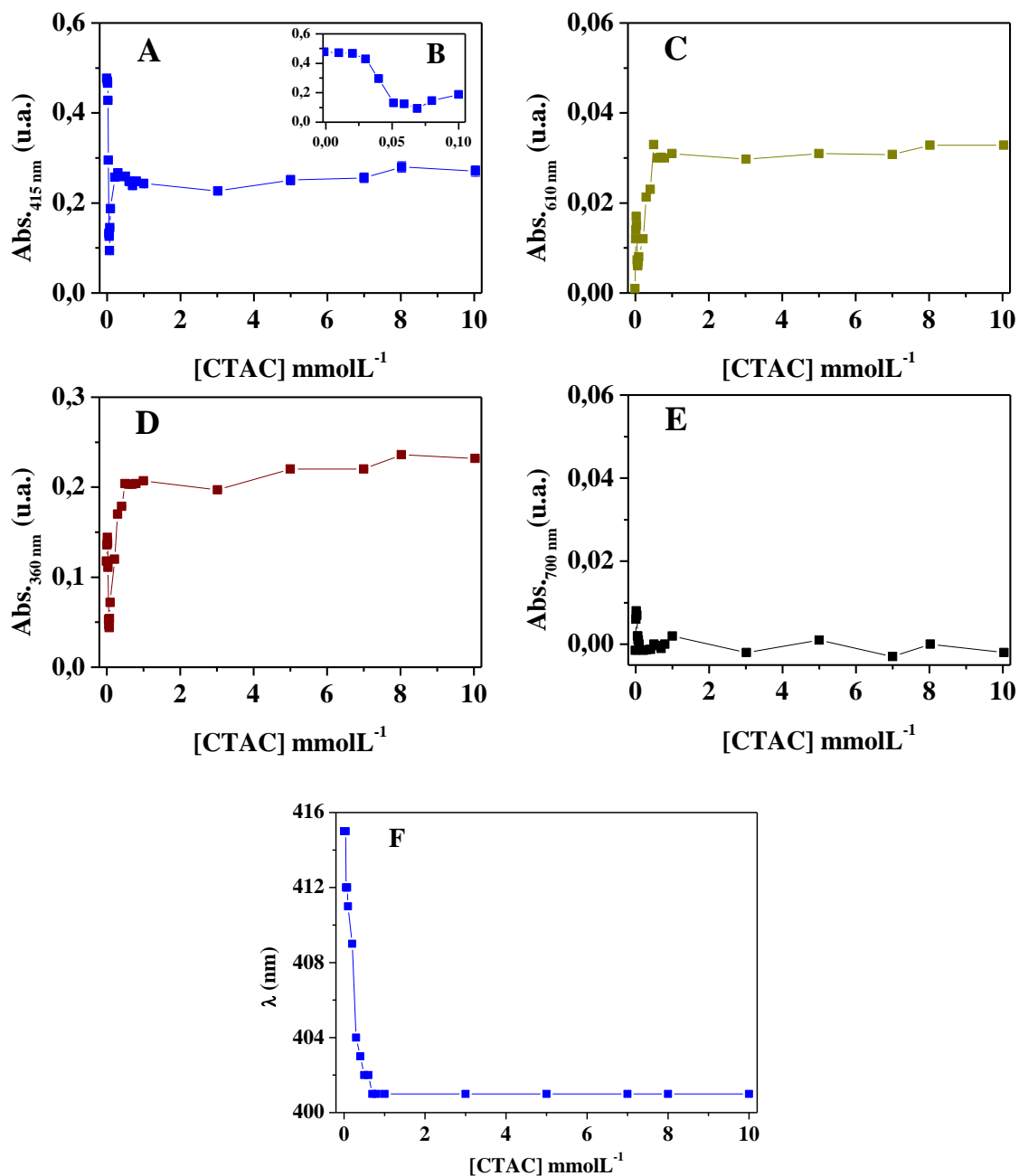
Fonte: Autor.

Na Figura 24A são apresentados os valores de absorbância em 415 nm em função da concentração de CTAC no pH 7,0, onde observa-se uma forte interação entre HbAg-CTAC e uma máxima formação de agregados proteína-surfactante na faixa de concentração de CTAC entre $0,01$ e $0,07 \text{ mmolL}^{-1}$. Acima de $0,07 \text{ mmolL}^{-1}$

os agregados de proteína-CTAC se ressolubilizam aumentando a intensidade de absorção, e após a concentração de $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC a intensidade de absorção se mantém constante até atingir altas concentrações de surfactante (Figura 24B). Na Figura 24D é apresentado os valores de absorção em 610 nm em função da concentração de CTAC. A adição de CTAC aumenta a intensidade de absorção em 610 nm indicando a oxidação da HbAg (POLI et al., 2006; SANTIAGO et al., 2007).

Na Figura 24E não foi observado um aumento da intensidade de absorção em 700 nm devido a centrifugação das amostras, que é eficiente na eliminação dos precipitados de HbAg-CTAC. Foi necessária uma concentração de CTAC superior a $0,04 \text{ mmolL}^{-1}$, para iniciar o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ da banda de Soret no pH 7,0, atingindo um platô com $0,7 \text{ mmolL}^{-1}$ de surfactante com um λ de 401 nm e se mantêm constante até a concentração de $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC (Figura 24F).

Figura 24 - (A) Absorbância em 415 nm; (B) Inserto da Figura 24A; (C) Absorbância em 610 nm; (D) Absorbância em 360 nm; (E) Absorbância em 700 nm e (F) Comprimento de onda máximo (λ_{\max}) da banda de Soret em função da concentração de CTAC, pH 7,0. Estes resultados são decorrentes dos apresentados nas Figura 22E e 22G da HbAg (0,1 mg/mL) em função da concentração de CTAC, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL^{-1} , pH 7,0.

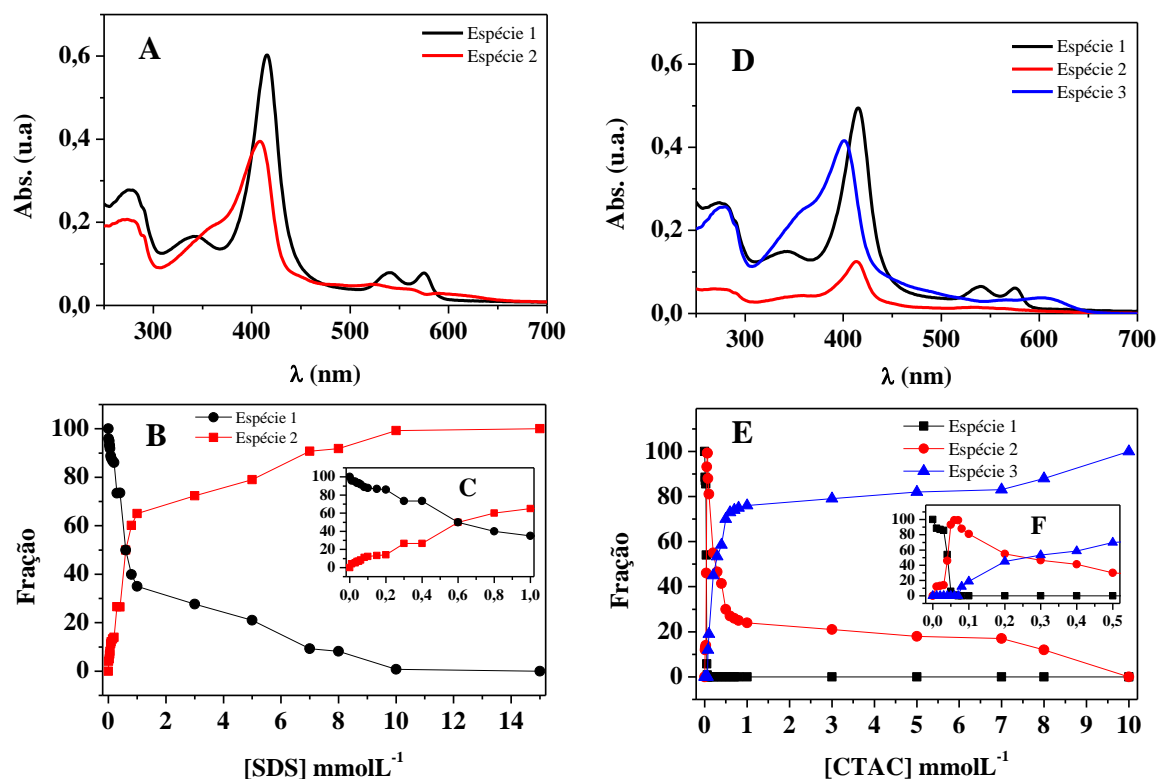


Fonte: Autor.

O conjunto de espectros apresentados na Figura 22 foram analisados pelo método de CCA, com o intuito de quantificar e separar as espécies presentes em solução. Desta forma, na presença de SDS no pH 7,0 ocorre a presença de duas espécies em solução (Figura 25A), sendo a espécie 1 associada à oxi-HbAg e a espécie 2 referente ao complexo HbAg-SDS. Na presença de CTAC ocorre a presença de três espécies em solução (Figura 25D), a espécie 1 correspondente à oxi-HbAg, a espécie 2 corresponde ao agregado HbAg-CTAC e espécie 3 é referente ao agregado HbAg-CTAC ressolubilizado. Estes resultados são similares ao encontrado por Santiago et al. (2007), envolvendo a interação da HbGp com o SDS e CTAC em valores de pH neutro e alcalino.

Por meio do método CCA foram obtidas as frações de cada espécie presente em solução, em função da concentração de ambos os surfactantes (Figuras 25B e 25E). Na presença de $0,6 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS ocorre a presença de 50% da espécie 2 (Figura 25C), que atinge 100% em solução com $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS (Figura 25B). Na presença de CTAC a espécie 2 atinge 50% com $0,04 \text{ mmolL}^{-1}$ de surfactante e chega a 100% em solução com $0,07 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC (Figura 25F). A espécie 3 alcança 50% com $0,25 \text{ mmolL}^{-1}$, e atinge 100% com $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de surfactante.

Figura 25 - Análises dos espectros de absorção óptica apresentados na Figura 22 pelo método CCA (PERCZEL et al., 1992). (A) Espectros de absorção óptica das espécies puras obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de SDS, pH 7,0; (B) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [SDS] pH 7,0; (C) Inseto da Figura 25B; (D) Espectros de absorção óptica das espécies puras obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de CTAC, pH 7,0; (E) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [CTAC] pH 7,0; (F) Inseto da Figura 25E.



Fonte: Autor.

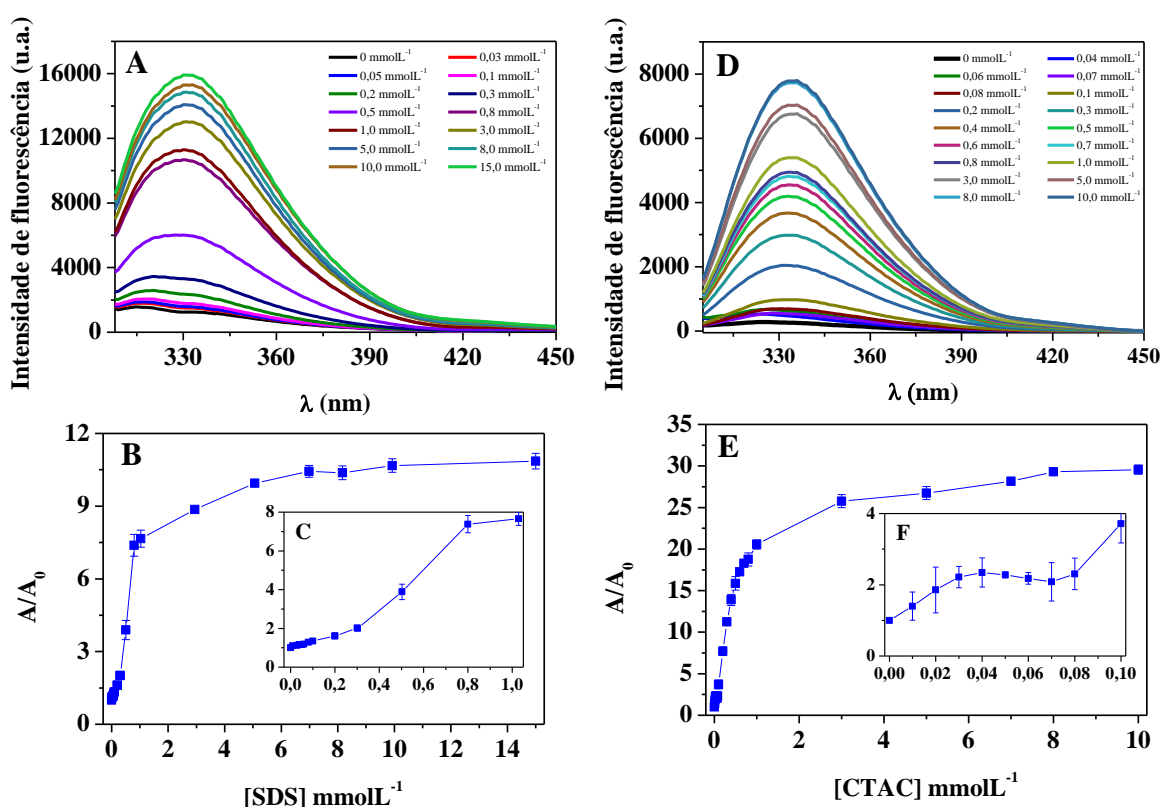
4.2.2 Emissão de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência da HbAg, em função da concentração de SDS em pH 7,0 são apresentados na Figura 26A. Na faixa de baixas concentrações de SDS, até $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$, ocorre um leve aumento na intensidade de emissão, que a partir de concentrações superiores aumenta de forma mais intensa (Figura 26E). Assim, ao comparar os resultados da HbAg-CTAC pH 7,0 com o sistema HbAg-SDS pH 5,0, observa-se que em ambos os sistemas temos a formação de agregados, porém a HbAg na presença de baixas concentrações de CTAC não se dissocia para depois se agregar. Já a HbAg na presença de baixas concentrações de SDS observa-se uma leve dissociação antes de ocorrer a agregação da proteína com o SDS.

Em concentrações acima de $0,07 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC ocorreu um aumento de 27 vezes a intensidade de fluorescência, indicando que após a ressolubilização do complexo proteína-surfactante, a HbAg encontra-se com os triptofanos muito mais expostos ao solvente, podendo indicar dissociação e desnaturação da proteína.

Vale destacar que o CTAC promoveu um ganho mais efetivo de fluorescência em relação ao SDS no pH 7,0. Na concentração de $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ o SDS causou um aumento na ordem de 7 vezes, enquanto que o CTAC atinge um aumento próximo de 21 vezes (Figuras 26B e 26E). De acordo com estes dados da área total de fluorescência normalizada, ambos os surfactantes foram capazes de promover o processo de dissociação da HbAg nos valores de pH 5,0 e 7,0.

Figura 26 - Espectros de emissão de fluorescência da HbAg, pH 7,0, em função da concentração de SDS (A) e CTAC (D); Área total de emissão de fluorescência da HbAg normalizada pela emissão da HbAg na presença de SDS (B), (C) inserto da Figura 26B, e na presença de CTAC (E); (F) Inserto da Figura 26E. As amostras de HbAg ($0,1 \text{ mgmL}^{-1}$) foram preparadas em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL^{-1} nos valores de pH 7,0.



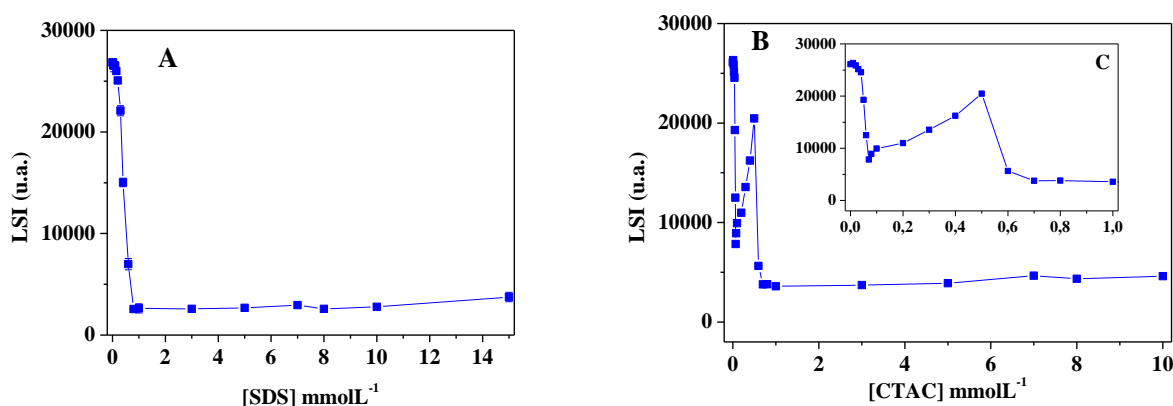
Fonte: Autor.

4.2.3 Medidas de LSI

O espalhamento de luz na ausência de SDS no valor de 7,0 (Figura 27A) tem um valor relativamente elevado como consequência da manutenção da proteína na sua estrutura íntegra. Após a adição de SDS, a intensidade reduz gradualmente até alcançar a concentração de $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$, onde se mantém constante até atingir a concentração máxima de SDS. Esta redução de intensidade está relacionada com a dissociação da estrutura oligomérica em subunidades de proteína menores promovida pela presença do surfactante aniônico SDS.

Já a LSI para o sistema HbAg-CTAC em pH 7,0 (Figura 27B) sofre uma redução gradual até em torno de $0,07 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC. Na faixa de concentração de $0,07$ á $0,6 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC observa-se um ligeiro aumento da intensidade de espalhamento, devido a formação de agregados HbAg-CTAC. Vale destacar que a intensidade de espalhamento desta espécie agregada não é maior que a proteína nativa, pois ao centrifugar as amostras, a maior parte dos agregados são descartados. Acima de $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC a LSI mantém se constante e o valor de LSI encontrado é menor que o da proteína Nativa, devido a dissociação da HbAg. Estes resultados corroboram com os resultados descritos anteriormente e os observados para a HbGp com os surfactantes SDS e CTAC (SANTIAGO et al., 2007; 2010).

Figura 27 - Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg ($0,1 \text{ mg/mL}$), em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL^{-1} em pH 7.0, em função da concentração dos surfactantes (A) SDS e (B) CTAC; (C) Inseto da Figura 27B.



Fonte: Autor.

4.2.4 Medidas de CD

Na Figura 28 são apresentados os espectros de dicroísmo circular da HbAg no pH 7,0 na ausência e na presença de dos surfactantes. O espectro de CD da HbAg no pH 7,0 é caracterizado por dois picos negativos de elipticidade em 210 e 220 nm, e um pico positivo em 198 nm.

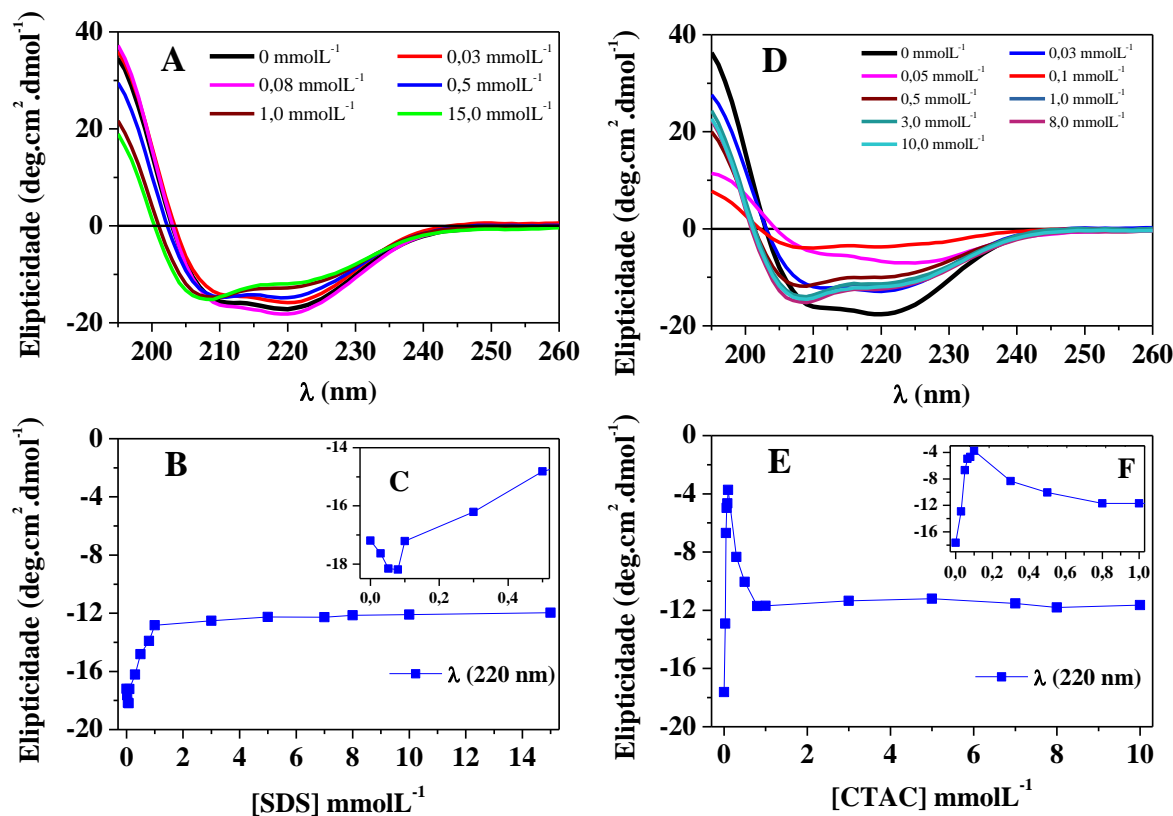
Na Figura 28A mostra que a adição de concentrações de SDS inferiores a $0,08 \text{ mmolL}^{-1}$ promove um aumento na elipticidade em 220 nm, que passa a diminuir de intensidade até atingir $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ (Figura 28B). Acima de $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS a elipticidade mantém se constante. Nas concentrações de SDS utilizada em pH 7,0 não foi observada a perda total da estrutura secundária da HbAg.

De acordo com a literatura a formação de um equilíbrio complexo entre HbAg e SDS pode ser resultante da interação eletrostática e hidrofóbica entre o surfactante e hemoproteínas (POLI et al., 2006; LIU et al., 2007; SANTIAGO et al., 2007). Deste modo, em valores de pH neutro, onde a superfície da proteína é majoritariamente negativa, a interação da HbAg com o surfactante aniônico deve estar associada as interações hidrofóbicas.

Considerando que o bolsão do heme é altamente hidrofóbico, e que a oxidação do heme é primordial para dar início a dissociação da proteína, torna-se necessária uma alta concentração de SDS para promover um desenovelamento parcial da proteína, tornando o heme mais susceptível de interação com o meio externo. A contribuição desta interação hidrofóbica pode justificar a alta concentração de SDS necessária para formar espécies oxidadas no pH 7,0.

Os resultados de CD para o sistema HbAg-CTAC, em pH 7,0 (Figura 28D), apontam para uma perda mais acentuada da estrutura secundária da proteína até a concentração de $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC. Na faixa de concentração de $0,1$ á $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC observa-se uma recuperação da estrutura secundária e acima de $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ a elipticidade permanece constante.

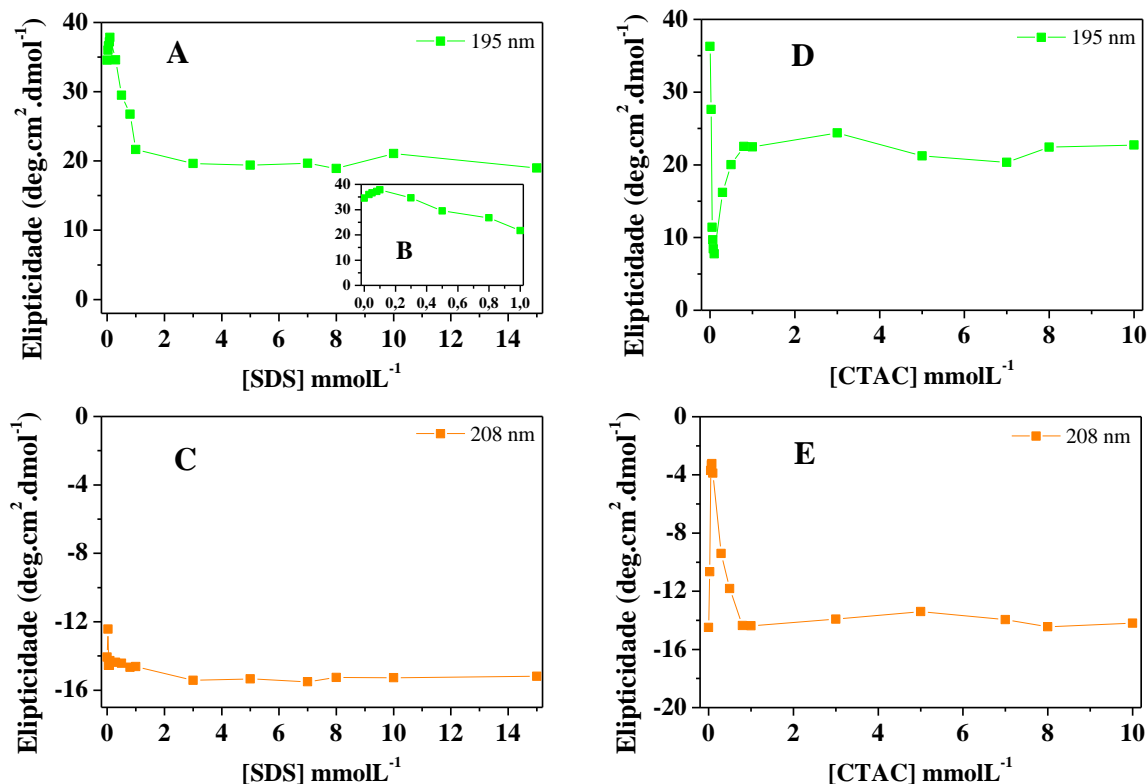
Figura 28 - Espectro de dicroísmo circular da HbAg (0,1 mg/mL), em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹ pH 7,0, em função da concentração dos surfactantes (A) SDS e CTAC (D); (B) Elipticidade em 220 nm em função da concentração de SDS; (E) Elipticidade em 220 nm em função da concentração de CTAC; (C e F) insertos das Figuras 29B e 29E.



Fonte: Autor.

A Figura 29A mostra que o SDS causou uma redução da elipticidade da banda em 195 nm, referente aos aminoácidos (Figura 29A), paralelamente ocorre a redução das α -hélices em 220 nm, enquanto que as α -hélices em 208 nm sofrem algumas oscilações, mas tende a se manter constante (Figura 29C). Assim como o SDS, o CTAC provocou mudanças de forma paralela entre a elipticidade em 195 nm (Figura 29D) e 220 nm (α -hélices), onde ambas as bandas sofrem uma redução até atingir a concentração de 0,1 mmolL⁻¹ de CTAC e em concentrações superiores aumentam até alcançar 0,8 mmolL⁻¹, permanecendo constantes e menos intensas que a elipticidade na ausência de CTAC. A banda das α -hélices em 208 nm sofre uma redução da elipticidade até 0,1 mmolL⁻¹ de surfactante e recupera sua intensidade em concentrações superiores até 0,8 mmolL⁻¹.

Figura 29 - Elipticidade da HbAg em 195 nm em função da concentração de SDS, pH 7,0 (A), e em função da concentração de CTAC (D); (B) Inserto da Figura 29A ;(C) Elipticidade em 208 nm em função da concentração de SDS e em função da concentração de CTAC (E). Estes dados foram obtidos dos espectros apresentados na Figura 28.



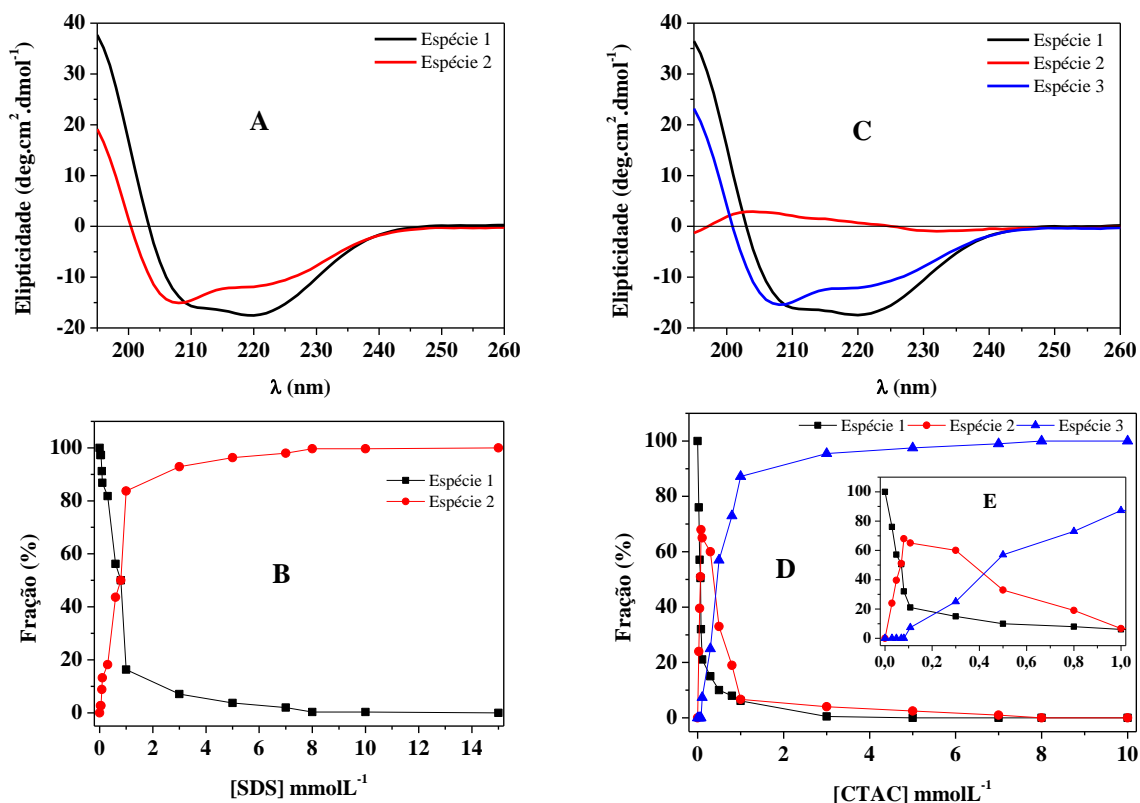
Fonte: Autor.

Os resultados dos espectros de CD analisados pelo método CCA corroboram com os espectros de UV-vis da HbAg SDS e com CTAC em pH 7,0. Após a deconvolução dos espectros da HbAg na presença de SDS foram quantificadas a coexistência de duas espécies puras em equilíbrio (Figura 30A), sendo a espécie 1 referente a HbAg na sua forma nativa e a espécie 2 referente a HbAg parcialmente desnaturada. A espécie 2 apresenta uma α -hélice em 208 nm mais intensa do que em 220 nm, diferente da nativa.

Com o CTAC há a coexistência de três espécies em solução (Figura 30C), a espécie 1 é referente a HbAg nativa, a espécie 2 é referente ao complexo HbAg-CTAC e a espécie 3 é relacionada ao complexo resolubilizado. A espécie 2 apresenta um conteúdo de estrutura secundária quase nulo, enquanto que a espécie 3 apresenta uma estrutura secundária próximo da nativa, mas com elipticidade em 208 nm mais intensa do que em 220 nm.

De acordo com método CCA referente aos espectros das medidas de CD, temos as frações de cada espécie presente em solução, em função da concentração de ambos os surfactantes (Figura 30B e 30D). Na Figura 30B observa-se que na presença de $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$ de SDS ocorre a formação de 50% da espécie 2, e atingindo 100% próximo de $8,0 \text{ mmolL}^{-1}$. Com o CTAC ocorre a formação de 50% da espécie 2 com $0,06 \text{ mmolL}^{-1}$ de surfactante (Figura 30E), alcançando sua maior contribuição na solução com $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de CTAC. A espécie 3 ocorre com 50% na concentração próxima de $0,4 \text{ mmolL}^{-1}$ e prevalece na solução em concentrações superiores a $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$.

Figura 30 - Análises dos espectros de CD apresentados na Figura 28 pelo método CCA (PERCZEL et al., 1992). (A) Espectros de CD das espécies obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de SDS, pH 7,0; (B) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [SDS] pH 7,0; (C) Espectros de CD das espécies obtidas pelo método CCA do conjunto de medidas da HbAg em função da concentração de CTAC, pH 7,0; (D) Frações das espécies presentes no equilíbrio em função da [CTAC] pH 7,0; (E) Inserto da Fig, 28D.



Fonte: Autor.

Assim, a interação da HbAg com os surfactantes iônicos SDS e CTAC em valores de pH 5,0 e 7,0 induz o processo de oxidação do centro metálico, que

origina a HbAg oxidada. Além de promover a dissociação da estrutura oligomérica da proteína, no qual causa a exposição dos resíduos de aminoácidos envolvidos nos contatos inter-subunidades. O processo de dissociação da estrutura oligomérica da hemoproteína se mostrou mais claro para o SDS em pH 7,0 e para o CTAC em pH 5,0. Na presença de baixas concentrações de SDS em pH 5,0 levou a precipitação de agregados, assim como baixas concentrações de CTAC em pH 7,0 provoca a agregação.

O processo de dissociação é reforçado por meio dos dados de LSI (Figura 17 e 27) e pelos dados de emissão de fluorescência (Figura 16 e 26). A literatura relata que surfactantes iônicos em baixas concentrações (abaixo da CMC - concentração micelar crítica) causam uma redução no conteúdo de α -hélice, originando a oxidação da forma oxi-Hb para a forma meta-Hb (AJLOO, et al., 2002). O SDS em pH 5,0 e o CTAC em pH 7,0 em altas concentrações promovem uma significativa recuperação do conteúdo de α -hélice e a ressolubilização dos agregados dão a forma oxidada/dissociada à hemoproteína.

Estas diferenças de interação entre os surfactantes no mesmo valor de pH está relacionado com o ponto isoelétrico da HbAg ($6,0 \pm 0,3$). O fato é que as Hbs extracelulares apresentam pI ácido (VINOGRADOV, 2004; ROUSSELOT et al., 2006; SANTIAGO et al., 2010). O valor do pH irá determinar qual tipo de carga prevalecerá na superfície da proteína, ou seja pH acima do pI prevalece cargas negativas e pH abaixo do pI prevalecem cargas positivas. Quando os resultados de SDS em pH 5,0 e CTAC em pH 7,0 são comparados, o efeito de ambos os surfactantes na HbAg são similares. Embora, seja necessária uma menor concentração de CTAC para provocar mudanças na estrutura da HbAg.

O comportamento espectral observado para ambos os surfactantes sobre a complexação com a HbAg no pH 5, e 7,0 apresentam simultâneo decréscimo da absorvidade molar e um deslocamento da banda de Soret para comprimento de onda menor (deslocamento para o azul). A contribuição de várias espécies oxidadas em cada espectro dificulta a identificação do espectro característico de cada espécie em solução, sendo esta uma característica de hemoglobinas (SVISTUNENKO et al., 2000).

Porém para os sistemas estudados, neste trabalho, podemos propor a existência de duas diferentes espécies oxidadas em equilíbrio: em pH 5,0, em altas

concentrações de surfactantes, os espectros apresentam uma banda de Soret próxima de 400 nm (Figura 12), podendo indicar a presença de uma histidina proximal como quinto ligante; em pH 7,0 um ombro próximo de 360 nm (Figura 22) pode sugerir a presença de espécies oxidadas com a molécula de água como o quinto ligante (GILLES-GONZALEZ et al., 1994; ILARI et al., 2002; UNO et al., 2003; KAMIMURA et al., 2003).

O SDS (em pH 5,0) e o CTAC (em pH 7,0) interagem fortemente com a HbAg causando significantes modificações na estrutura oligomérica, que afeta inicialmente a primeira esfera de coordenação do Ferro, promovendo a oxidação do centro metálico. O estado férrico do heme pode demonstrar uma baixa estabilidade oligomérica em relação ao estado ferroso, favorecendo algum tipo de efeito sinérgico de dissociação da hemoproteína. A banda LMCT observada entre 600 – 650 nm (Figuras 12 e 22) indicam a presença de espécies de meta-hemoglobina de alto-spin.

Considerando que em pH 5,0 os surfactantes em interação com a HbAg promoveram o processo de autooxidação e subsequentemente a formação de espécies aquometá (Figura 12), e que as concentrações para o efeito do CTAC na HbAg foram maiores em relação ao SDS, claramente, este efeito ocorre devido o valor de pH estar abaixo do *pI* da hemoproteína. Assim, o complexo com os ligantes bis-histidina não estaria completo e a espécie aquometá coexistiria com hemicromo e outras espécies oxidadas. A ocorrência de espécies aquometá na presença de surfactantes em pH 5,0, pode sugerir que a HbAg possui os grupos heme estejam mais empacotados do que os em pH 7,0.

Em um estudo realizado por Tofani et al. (2004) ocorre a coexistência das espécies aquometá, hemicromo e outras espécies oxidadas, resultante da interação de SDS com mioglobina na sua forma nativa. Além disso Gebicka e colaboradores (GEBICKA; GEBICKI, 1999) descreveram um equilíbrio de complexos de baixo e alto-spin no sistema SDS e ferricitocromo *c*. Otzen e colaboradores (2002) relatam que o SDS se liga a pequena proteína S6, mas causaria um desenovelamento acima da CMC.

Embora, Ollerich et al. (2003) consideram que a interação entre o citocromo *c* e SDS abaixo e acima da CMC ocorre em diferentes formas. Segundo os autores as alterações da estrutura do heme são comuns em ambos os modos de interação,

implicando que os sítios de interação eletrostática e/ou hidrofóbica deveria estar na vizinhança do bolsão do heme na estrutura do citocromo *c*.

A estrutura da vizinhança do grupo heme da HbAg ainda não foi completamente entendida, mas com base neste estudo, é possível sugerir uma similar interação desta hemoproteína para ambos os surfactantes nos valores de pH estudados. Lembrando que, os surfactantes apresentam intensidade de interação inversa com a HbAg nos valores de pH 5,0 e 7,0.

Chattopadhyay e Mazumdar (2003), relatam que interações tanto iônicas como hidrofóbicas entre hemoproteínas e SDS em pH 7,0 pode ser importante para a formação de um equilíbrio complexo envolvendo algumas espécies oxidadas do citocromo *c*. Assim, interações hidrofóbicas promovidas pelo SDS (pH 7,0) e pelo CTAC (pH 5,0) pode ser um importante fator para a formação de espécies férricas observadas neste trabalho. Considerando que o grupo heme da HbAg é altamente hidrofóbico, seria necessário uma alta concentração de SDS (em pH 7,0) e CTAC (em pH 5,0) para produzir uma configuração de heme exposto ao solvente. Neste estado os resíduos das cadeias polipeptídicas em torno do grupo heme sofreria um desenovelamento parcial, fazendo o heme mais susceptível de interação com o meio externo.

Santiago et al. (2007), relatam que para o sistema HbGp-surfactantes foi necessária uma maior concentração de SDS em relação ao CTAC para promover uma maior interação hidrofóbica com a HbGp em pH 7,0. Os autores associam este comportamento ao fato do CTAC apresentar uma cadeia carbônica longa de metileno com 16 carbonos, enquanto o SDS uma cadeia com 12 carbonos. Por isso, o CTAC seria mais hidrofóbico do que o SDS, este efeito de combinação de íons com resíduos aniônicos ácidos da HbGp faz a interação eletrostática com a proteína mais relevante, levando a um desenovelamento parcial, transição para hemicromo sem produção de espécies aquometa e precipitação em baixas concentrações.

Como mencionado anteriormente, os surfactantes aniônicos são mais efetivos em causar mudanças no conteúdo de α -hélice da estrutura secundária de proteínas do que os catiônicos (TOFANI et al., 2004). Embora, no caso da interação entre a HbAg com o SDS em pH 7,0 neste estudo isso não acontece.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se propor que o processo de desnaturação da HbAg na presença de surfactante iônicos envolve o fenômeno da agregação dependendo do pH do meio. Ambos os surfactantes estudados (CTAC e SDS) promoveram o processo de oxidação e dissociação da HbAg nos dois valores de pH avaliados (5,0 e 7,0), sendo necessário uma concentração menor de CTAC para provocar mudanças na estrutura oligomérica da HbAg quando comparado com o SDS.

Em valores de pH neutro e ácido (7,0 e 5,0) os processos de desnaturação, dissociação, agregação e oxidação se sobrepõem. Pois a HbAg ao se oxidar concomitantemente inicia-se o seu processo de dissociação. Porém a desnaturação somente ocorre após a proteína se oxidar, dissociar e/ou agregar-se. Não foram apresentados neste trabalho os estudos quanto a reversibilidade do processo.

Entretanto, vale dizer que após a oxidação da HbAg seja na presença de altas concentrações de surfactantes ou valores de pH alcalinos, o retorno do pH da solução para pH 7,0 ou retirada do surfactante por diálise a proteína não recupera a estrutura secundária e o espectro de absorção é bastante diferente da proteína no seu estado nativo (dados não mostrados).

Por meio dos resultados descritos é possível afirmar que a HbAg apresentou uma forte interação com o SDS no pH 5,0 e com o CTAC no pH 7,0, e para uma faixa de concentração de surfactante abaixo da CMC foram observadas a formação de agregados proteína-surfactante. Esta forte interação pode estar associada inicialmente as interações eletrostáticas, porém as interações hidrofóbicas são bastante relevantes.

As medidas de CD sugerem que os contatos iônicos na interação SDS-HbAg em pH 5,0 e CTAC-HbAg em pH 7,0 prevalecem, enquanto que nos sistemas CTAC-HbAg em pH 5,0 e SDS-HbAg em pH 7,0 as interações hidrofóbicas são mais significantes. A espectroscopia de emissão de fluorescência mostrou um significativo aumento na emissão sob a adição de ambos os surfactantes SDS e CTAC, associada à dissociação da hemoglobina e a reduzindo a transferência de energia efetiva dos triptofanos para os hemes nas várias subunidades da hemoproteína. Estes dados estão de acordo com os apresentados por intensidade de espalhamento de luz.

Perspectiva futura

Durante o desenvolvimento do presente projeto, novas informações foram obtidas sobre a estabilidade da oxi-HbAg frente aos processos de oxidação/dissociação oligomérica e desnaturação na presença dos surfactantes iônicos SDS e CTAC, nos valores de pH 5,0 e 7,0. A técnica espectroscópica de absorção ótica mostrou ser uma importante ferramenta para a investigação do processo de oxidação da HbAg neste sistema, tendo em vista os resultados obtidos. De forma complementar o uso da espectroscopia de emissão de fluorescência, acompanhada da intensidade espalhamento de luz no fluorímetro, possibilitaram monitorar o processo de dissociação e desnaturação da hemoproteína.

Por isso, estudos complementares usando outros agentes caotrópicos e monitorados por outras técnicas poderão ser realizados, com o propósito de dar continuidade à esta linha de pesquisa do Laboratório de Biomoléculas do Campus de Registro, UNESP. Assim poderemos avançar no entendimento dos processos de oxidação/dissociação, re-associação e desnaturação desta hemoglobina extracelular gigante.

Partindo deste pressuposto, podemos realizar titulações da HbAg em função de diferentes concentrações de ureia, com o propósito de obter uma melhor compreensão sobre as interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre a hemoproteína e ligantes, além de acompanhar o processo de desnaturação da HbAg. Estes experimentos poderão ser acompanhados por medidas de absorção ótica, fluorescência estática, dicroísmo circular, espalhamento de luz dinâmico e SAXS (Espalhamento de Raio X de baixo ângulo).

O estudo com a HbAg nos motivou a iniciarmos um estudo com a hemocianina gigante extraída do crustáceo *Macrobrachium acanthurus* (HcMa), por isso no projeto de doutorado será realizado estudos de caracterização biofísica da referida hemocianina além de avaliarmos as suas atividades fenoxidase (PO), antifúngica e antibacteriana.

REFERÊNCIAS

- AJLOO, D.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; HAKIMELAHI, G. H.; SABOURY, A. A.; GHARIBI, H. The effect of dodecyl trimethylammonium bromide on the formation of methemoglobins and hemichrome. **Colloids and Surface**, v. B26, p. 185-196, 2002.
- BACHEGA, J. F. R. **Estrutura cristalográfica da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, um complexo de 3.6 mega Daltons**. 2013. 165 f. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- BACHEGA, J. F. R.; MALUF, V.; ANDI, B.; PEREIRA, H. D. M.; CARAZZOLLEA, F.; ORVILLE, A. M.; HORJALES, E. The structure of the giant haemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Acta Crystallographica D**, v. 71, p. 1257-1271, 2015.
- BISPO, J. A. C.; LANDINI, G. F.; SANTOS, J. L. R.; NORBERTO, D. R.; BONAFE, C. F. S. Tendency for oxidation of annelid hemoglobin at alkaline pH and dissociated states probed by redox titration. **Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology**, v.141, n. 4, p.498-504, 2005.
- BISPO, J. A. C.; SANTOS, J. L. R.; LANDINI, G. F.; GONÇALVES, J. M.; BONAFE, C. F. S. pH dependence of the dissociation of multimeric hemoglobin probed by high hydrostatic pressure. **Biophysical Chemistry**, v. 125, n. 2/3, p. 341-349, 2007.
- BOFFI, A.; DAS, T. K.; DELLA LONGA, S.; SPAGNUOLO, C.; ROUSSEAU, D. L. Pentacoordinate heme derivatives in sodium dodecyl sulfate micelles: model systems for the assignment of the fifth ligand in ferric heme proteins. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 2, p. 1143-1149, 1999.
- BRAMANTI, E.; ALLEGRINI, C.; ONOR, M.; RASPI, G.; SKOGERBOE, K. J.; SYNOVEC, R. E. Flow injection analysis with diode array absorbance detection and dynamic surface tension detection for studying denaturation and surface activity of globular proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 351, n. 1, p.100-113, 2006.
- CARVALHO, F. A. O.; ALVES, F. R.; TABAK, M. Ionic surfactants-*Glossoscolex paulistus* hemoglobin interactions: characterization of species in the solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 670-681, 2016.
- 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.
- 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.

- CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; ALVES, F. R.; TABAK, M. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, n. 1, p. 333-341, 2013a.
- 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, n. 1, p. 340-348, 2013b.
- 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.
- 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**, v. 111, p. 561-570, 2013.
- CARVALHO, J. W. P.; CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Thermal stability of extracellular hemoglobin of *Rhinodrillus alatus* (HbRa): DLS and SAXS studies. **European Biophysics Journal**, v. 45, n. 6, p. 549-563, 2016.
- CHABASSE, C.; BAILLY, X.; SANCHEZ, S.; ROUSSELOT, M.; ZAL, F. Gene structure and molecular phylogeny of the linker chains from the giant annelid hexagonal bilayer hemoglobins. **Journal of Molecular Evolution**, v. 63, n. 3, p. 365-374, 2006.
- CHAIRES, J. B. Calorimetry and thermodynamics in drug desing. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, p. 135-151, 2008.
- CHATTOPADHYAY, K.; MAZUMDAR, S. Stabilization of partially folded states of cytochrome C in aqueous surfactant: effects of ionic and hydrophobic interactions. **Biochemistry**, v. 42, p. 14606-14613, 2003.
- EATON, W.; HOFRICHTER, J. Specific spectroscopic properties of hemoglobins **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 175-262, 1983.
- GEBICKA, L.; GEBICKI, J. L. Kinetic studies on the interaction of ferricytochrome C with anionic surfactants. **Journal of Protein Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 165-172, 1999.
- GERACI, G.; PARKHURST, L. Specific spectroscopic properties of hemoglobins. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 263-275, 1983.
- GILLES-GONZALEZ, M. A.; GONZALEZ, G.; PERUTZ, M. F. Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. **Biochemistry**, v. 33, p. 8067-8073, 1994.

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

HARRINGTON, J. P. Role of monovalent divalent-cations on multimeric *Lumbricus* hemoglobin stabilization. **Biophysical Journal**, v. 66, p. A361-A361, 1994.

HIRSCH, R. E.; VIDUGIRIS, G. J. A.; FRIEDMAN, J. M.; HARRINGTON, J. P. Alteration of tryptophan fluorescence properties upon dissociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1205, n. 2, p. 248-251, 1994.

ILARI, A.; BONAMORE, A.; FARINA, A.; JOHNSON, K. A.; BOFFI, A. The X-ray structure of ferric *Escherichia coli* flavohemoglobin reveals an unexpected geometry of the distal heme pocket. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 23725-23732, 2002.

KAMIMURA, S.; MATSUOKA, A.; IMAI, K.; SHIKAMA, K. The swinging movement of the distal histidine residue and the autoxidation reaction for midge larval hemoglobins. **European Journal Biochemistry**, v. 270, n. 7, p. 1433-1474, 2003.

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.

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

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

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

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum, c1983. 496 p.

LIU, W.; GUO, X.; GUO, R. The interaction between hemoglobin and two surfactants with different charges. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 5, p. 548-557, 2007.

MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; DAYER, M. R.; NOROUZI, P.; SHAMSIPUR, M.; YEGANEH-FAAL, A.; CHAICHI, M. J.; GHOURCHIAN, H. O. Aquamethemoglobin reduction by sodium n-dodecyl sulfate via coordinated water oxidation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 30, n. 1/2, p. 139-146, 2003.

MOREIRA, L. M.; POLI, A. L.; COSTA FILHO, A. J.; IMASATO, H. Pentacoordinate and hexacoordinate ferric hemes in acid medium: EPR, UV-Vis and CD studies of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. **Biophysical Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 62-72, 2006.

MOREIRA, L. M.; SANTIAGO, P. S.; ALMEIDA, E. V. de; TABAK, M. Interaction of giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) with zwitterionic surfactant N-hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS): effects of oligomeric dissociation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 153-163, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Funções das proteínas. In: _____. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. Cap. 5, p.156-189.

OTZEN, D. E.; OLIVEBERG, M. Burst-phase expansion of native protein prior to global unfolding in SDS. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 5, p. 1231-1240, 2002.

PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, G. D. Analysis of the circular-dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. **Analytical Biochemistry**, v. 203, n. 1, p. 83-93, 1992.

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.

RESSETI, R. R.; Densidade populacional, biomassa e espécies de minhocas em ecossistemas de áreas urbanas. **Scientia Agraria**, v. 7, n. 1/2, p. 61-66, 2006.

RIFKIND, J. M.; ABUGO, A.; LEVY, A.; HEIM, J. Detection, formation, and relevance of hemichromes and hemochromes. **Methods in Enzymology**, v. 231, p. 449-480, 1994.

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

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

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

SALEHI, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; FOTOUHI, L.; YOUSEFINEJAD, S.; SHOURIAN, M.; HOSSEINZADEH, R.; HABIBI-REZAEI, M. Heme degradation upon production of endogenous hydrogen peroxide via interaction of hemoglobin with sodium dodecyl sulfate. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 133, p. 11-17, 2014.

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.

SANTIAGO, P. S.; MOREIRA, L. M.; ALMEIDA, E. V. de; 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 et Biophysica Acta: General Subjects**, v. 1770, n. 4, p. 506-517, 2007.

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.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Cengage Learning, c2006. 999 p.

STRYER, L. **Biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 1995. 1064 p.

SVISTUNENKO, D.A.; SHARPE, M.A.; NICHOLLS, P.; WILSON, M.T.; COOPER, C. E. A new method for quantitation of spin. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 142, n. 2, p. 266-275, 2000.

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: INNOCENTI, A. (Ed.). **Stoichiometry and research: the importance of quantity in biomedicine**. Rijeka: InTech, 2012. Chap. 15, p. 337-356.

TOFANI, L.; FEIS, A.; SNOKE, R. E.; BERTI, D.; BAGLIONI, P.; SMULEVICH, G. Spectroscopic and interfacial properties of myoglobin/surfactant. **Biophysical Journal**, v. 87 p. 1186-1195, 2004.

UNO, T.; SAKAMOTO, R.; TOMISUGI, Y.; ISHIKAWA, Y.; WILKINSON, A. J. Inversion of axial coordination in myoglobin to create a "Proximal" ligand binding pocket. **Biochemistry**, v. 42, p. 10191-10199, 2003.

VAN HOLD, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. **Principles of physical biochemistry**. Upper Saddle River: Pearson Education, 2006. 710 p.

VINOGRADOV, S. N. Spectrophotometric determination of iron in heme proteins. **Methods in Enzymology**, v. 123, p. 320-323, 1986.

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.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1616 p.

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