

LIERGE RAMOS

**ESTUDOS BIOFÍSICOS DA HEMOCIANINA DO CAMARÃO
Macrobrachium acanthurus (HCMAC) NA PRESENÇA DE
AGENTES CAOTRÓPICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Soares Santiago

Co-orientador: Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho

Araraquara
2022

R175e Ramos, Lierge
Estudos biofísicos da hemocianina do camarão *Macrobrachium acanthurus* (HcMac) na presença de agentes caotrópicos e atividade biológica / Lierge Ramos. -- Araraquara, 2022
101 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Patrícia Soares Santiago
Coorientador: Norival Alves Santos Filho

1. Hemoproteínas. 2. Biomoléculas. 3. Decápode (Crustáceo). 4. Surfactantes. 5. Indução enzimática. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

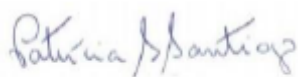
TÍTULO DA TESE: "Estudos Biofísicos da Hemocianina do Camarão *Macrobrachium acanthurus* (HcMac) na Presença de Agentes Caotrópicos e Atividade Biológica"

AUTOR: LIERGE RAMOS

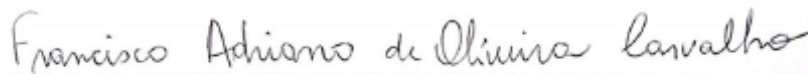
ORIENTADORA: PATRICIA SOARES SANTIAGO

COORIENTADOR: NORIVAL ALVES SANTOS FILHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:



Prof.ª Dr.ª PATRICIA SOARES SANTIAGO (Participação Virtual)
Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro



Prof. Dr. FRANCISCO ADRIANO DE OLIVEIRA CARVALHO (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Exatas - UNIFESSPA - Marabá



Prof. Dr. PAULO RICARDO DA SILVA SANCHES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Profa. Dra. PATRÍCIA GLEYDES MORGANTE (Participação Virtual)
Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro



Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP - Assis

Araraquara, 15 de setembro de 2022

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.

À minha namorada Renata.

Aos meus sobrinhos João Vitor, Pedro José, Jaíne, Mateus Antônio e Vitória.

Aos meus cunhados Reginaldo, Rogério, Arnaldo e Dircéia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me concedido a graça de realizar esse sonho. Por estar sempre ao meu lado, iluminando o meu caminho.

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 atenção, apoio e amor.

Aos meus irmãos e irmãs por sempre me incentivarem e pelo carinho.

À minha namorada, Renata, por estar sempre presente em tantos momentos, a sua força me tornou forte, a sua calma me trouxe equilíbrio e o seu sorriso iluminou o meu mundo. Obrigado por fazer parte da minha vida!

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

Ao meu co-orientador, Norival Alves Santos Filho, disposição e atenção despendida.

Aos meus companheiros de laboratório Claudemir, Jonathan, Ísis, Karyna, 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.

Aos meus queridos amigos Gustavo, Raphael, Wanilton, Camila, Mateus, Elisete pelo ombro amigo e pela força.

Ao meu amigo Daniel "Punkpolo" pela amizade e momentos de descontração ao longo dos anos na Beerland.

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

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

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

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

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

As hemocianinas (Hcs) são grandes proteínas extracelulares responsáveis por inúmeras funções em artrópodes e moluscos. Representam cerca de 50 – 90% da hemolinfa, e tem como principais funções, o transporte de O₂ e atuar no mecanismo de defesa imunológica. Em geral, as Hcs mantem sua integridade funcional e estrutural em uma ampla faixa de temperatura (entre -20 e 90°C) e apresentam atividade fenoloxidase (PO) latente quando o animal é exposto a condições de estresse. Em artrópodes, as Hcs apresentam-se na forma de seis cadeias monoméricas agregadas, na forma de um hexâmero ou oligohexâmeros contendo até oito hexâmeros (8 × hexâmeros). Assim, o objetivo geral deste projeto de doutorado foi purificar, caracterizar, avaliar atividade biológica e PO da Hc do camarão *Macrobrachium acanthurus* (HcMac). Para estes estudos foram realizados cromatografia líquida de exclusão molecular, eletroforese monodimensional SDS-PAGE, AUC (do inglês Analytical Ultracentrifugation), MALDI-TOF-MS (do inglês Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), medidas espectroscópicas variando o pH, concentração de ureia e SDS (dodecil sulfato de sódio), e estudos de atividade PO e antimicrobiana. Os resultados dos experimentos de SDS-PAGE, AUC e MALDI-TOF-MS indicam que a HcMac é formada por cadeias polipeptídicas de 75 - 76 kDa formando uma estrutura de 450 kDa, ou seja, um hexâmero é composto por 6 cadeias monomérica de 75 KDa (1×hexâmero). As medidas UV-vis mostraram que a afinidade do centro di-cobre pelo oxigênio é dependente do valor de pH. Os resultados de emissão de fluorescência indicaram alterações na estrutura terciária da proteína devido às mudanças do valor de pH do meio, sendo que este influenciou na exposição dos resíduos de Triptofano ao solvente. Através das análises de intensidade de espalhamento de luz (LSI – do inglês Light Scattering Intensity) medidas no espectrofluorímetro foi possível sugerir que a HcMac apresenta ponto isoelétrico entre 4,3 e 5,3, assim como a hemocianina de outros camarões. A ureia induziu o processo de desnaturação, mas em pH 7,0 a HcMac demonstrou ser mais estável e foi necessário uma concentração maior de desnaturante em relação ao pH 5,0. A ureia e o SDS reduziram a intensidade de fluorescência, deslocaram o comprimento de onda máximo (λ_{max}) para valores maiores, devido ao processo de dissociação, que expôs o centro di-cobre da hemoproteína (cobre é supressor de fluorescência), além de favorecer a exposição do Triptofano ao solvente. Os resultados de LSI da HcMac mostram que em pH 5,0 houve uma forte interação entre proteína-SDS em concentrações inferiores a 1,0 mmol.L⁻¹, pois a LSI aumentou em 12 vezes sua intensidade em relação HcMac pura em solução. A HcMac nativa apresentou atividade PO induzida pelo surfactante SDS e não demonstrou ação antimicrobiana nos testes realizados. Os resultados obtidos até o momento são relevantes, pois trazem informações importantes para avançarmos nos estudos de caracterização e aplicação biotecnológica da HcMac.

Palavras-chave: Hemocianina. Macromolécula. Crustáceo.

ABSTRACT

Hemocyanins (Hcs) are large extracellular proteins responsible for numerous functions in arthropods and mollusks. They represent about 50-90% of the hemolymph, and their main functions are O₂ transport and immune defense mechanisms. They maintain their functional and structural integrity over a wide temperature range (between -20 and 90°C) and exhibit latent phenoloxidase (PO) activity when the animal is exposed to stress conditions. In arthropods Hcs are presented as six monomeric chains aggregated in the form of a hexamer or oligohexamers containing up to eight hexamers (8 x hexamers). Thus, the objective of this work was to perform the extraction/purification, structural characterization, evaluate biological activity and PO of Hc from *Macrobrachium acanthurus* shrimp (HcMac). Molecular exclusion liquid chromatography, one-dimensional SDS-PAGE electrophoresis, AUC (Analytical Ultracentrifugation), MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), spectroscopic measurements varying pH and urea and SDS (sodium dodecyl sulfate) concentration, and PO and antimicrobial activity studies were performed. The results of SDS-PAGE, AUC and MALDI-TOF-MS experiments indicated that HcMac is formed by 75 - 76 kDa polypeptide chains forming a 450 kDa structure, i.e. one hexamer is composed of 6 monomeric 75 kDa chains (1×hexamer). UV-vis measurements showed that the affinity of the di-copper center for oxygen is pH value dependent. The fluorescence emission results indicated changes in the tertiary structure of the protein due to changes in the pH value of the medium, in which pH influenced the exposure of Tryptophan residues to the solvent. Through the analysis of the light scattering intensity (LSI) measured in the spectrofluorimeter, it was possible to suggest that HcMac presents an isoelectric point between 4.3 and 5.3, as does hemocyanin from other shrimp. Urea induced the denaturation process, but at pH 7.0 HcMac proved to be more stable and a higher concentration of denaturant was required compared to pH 5.0. Urea and SDS reduced the fluorescence intensity, shifted the maximum wavelength (λ_{max}) to higher values, due to the dissociation process, which exposed the di-copper center of the hemoprotein (copper is fluorescence suppressor), and also favored the exposure of Tryptophan to the solvent. The LSI results of HcMac show that at pH 5.0 there was a strong protein-SDS interaction at concentrations lower than 1.0 mmol.L⁻¹, as the LSI increased by a factor of 12 times its intensity compared to pure HcMac in solution. HcMac showed PO activity induced by the SDS surfactant and did not show antimicrobial action in the tests performed. The results obtained so far are relevant because they bring important information to advance the characterization studies and biotechnological application of HcMac.

Keywords: Hemocyanin. Macromolecule. Crustacean.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de sítio de ligação da hemocianina de caranguejo-ferradura, <i>Limulus polyphemus</i>	16
Figura 2 - Espectro de absorção de 0,3 mg.mL ⁻¹ da Hc de <i>L. polyphemus</i> in 100 mmol.L ⁻¹ de tampão Tris-HCl, pH 7,5.....	17
Figura 3 - Organização estrutural de hemocianinas de moluscos.....	22
Figura 4 - Organização estrutural de hemocianinas de artrópodes.....	25
Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de ionização suave da substância a ser analisada.....	34
Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de tempo de vôo.....	35
Figura 7 - Ilustração do diagrama dos níveis de energia eletrônicos de uma molécula.....	40
Figura 8 - Diagrama de Jablonsk.....	41
Figura 9 - Foto do animal <i>Macrobrachium acanthurus</i> anestesiado para extração de sua hemolinfa.....	45
Figura 10 - Ilustração do tubo com amostra após o processo de purificação por ultracentrifugação.....	52
Figura 11 - Perfil de eluição da hemoproteína HcMac (50,0 mg.mL ⁻¹) em cromatografia líquida de exclusão de tamanho, após purificação por ultracentrifugação.....	53
Figura 12 - Perfil de eluição HcMac (10,0 mg.mL ⁻¹) por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) em pH 7,0 e pH 9,2, à 25 °C.....	54
Figura 13 - Gel de eletroforese SDS-PAGE do Pico II (HcMac) da fração F _C da hemolinfa de <i>Macrobrachium acanthurus</i> após cromatografia de exclusão de tamanho (SEC).....	55
Figura 14 - Espectro de MALDI-TOF-MS da hemocianina de <i>Macrobrachium acanthurus</i> (HcMac), pH 7,0.....	57
Figura 15 - Coeficiente de sedimentação obtido para a HcMac em pH 7,0 e massa molecular.....	58
Figura 16 - Espectros de absorção óptica da HcMac (1,6 mg.mL ⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmol.L ⁻¹ , na faixa de pH entre 3,7 – 10,5.....	60
Figura 17 - Espectros de emissão de fluorescência da HcMac (1,6 mg.mL ⁻¹), em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L ⁻¹	62
Figura 18 - Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HcMac (1,6 mg.mL ⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L ⁻¹ , em diferentes valores de pH.....	64

Figura 19 - Espectro de absorção óptica da HcMac 1,6 mg.mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L ⁻¹ , em pH 5,0 e 7,0.....	66
Figura 20 - Espectro de absorção óptica da HcMac 1,6 mg.mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato 20 mmol.L ⁻¹ pH 5,0, em função da concentração de ureia.....	67
Figura 21 - Espectro de absorção óptica da HcMac 1,6 mg.mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato 20 mmol.L ⁻¹ pH 7,0, em função da concentração de ureia.....	68
Figura 22 - Espectros de fluorescência da HcMac 1,6 mg.mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato 20 mmol.L ⁻¹ com o pH 5,0, em função da concentração de ureia.....	69
Figura 23 - Espectros de fluorescência da HcMac 1,6 mg.mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato 20 mmol.L ⁻¹ com o pH 7,0, em função da concentração de ureia.....	70
Figura 24 - Intensidade de espalhamento de luz em diferentes concentrações de ureia no pH 5,0 e pH 7,0.....	71
Figura 25 - Espectro de absorção óptica da HcMac 1,6 mg.mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L ⁻¹ pH 7,0, em função da concentração de SDS.....	72
Figura 26 - Espectro de absorção óptica da HcMac 1,6 mg.mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L ⁻¹ pH 5,0, em função da concentração de SDS.....	73
Figura 27 - Espectros de fluorescência da HcMac (1,6 mg.mL ⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L ⁻¹ pH 7,0, em função da concentração de SDS.....	74
Figura 28 - Espectros de fluorescência da HcMac (1,6 mg.mL ⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L ⁻¹ pH 5,0, em função da concentração de SDS.....	75
Figura 29 - LSI da HcMac (1,6 mg.mL ⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato, em função da concentração de SDS em pH 7,0 e pH 5,0.....	76
Figura 30 - Indução da atividade PO na presença de SDS, após 5 minutos de incubação, e cinética relativa da indução de PO na presença de 1,0 mmol.L ⁻¹ de SDS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

Å - Ångström

AMPs - Peptídeos antimicrobianos

AUC - Ultracentrifugação analítica

BSA - Albumina de soro bovino

c(M) - Coeficiente de distribuição de massas moleculares

c(S) - Coeficientes de sedimentação

Ca - Cálcio

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CaH - Hemocianina de *Cornu aspersum*

CAMHB - Caldo Mueller-Hinton ajustado aos cátions

CD - Dicroísmo circular

Cu - Cobre

Deoxi-Hc - Hemocianina desoxigenada

DLS - Espalhamento de luz dinâmico

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

f/f_0 - Razão friccional

F_c - Força centrípeta

F_{Emp} - Força de empuxo

F_f - Força friccional

FU - Unidade funcional

Hc – Hemocianina

Hcs - Hemocianinas

Hc-d PO - Fenoloxidase derivada de hemocianina

HcMac - Hemocianina de *Macrobachium acanthurus*

HIH - Hemocianina de *Helix lucorum*

HpH - Hemocianina de *Helix pomatia*

HtH - Hemocianina de *Haliotis tuberculata*

KLH - Hemocianina de *Megathura crenulata* (keyhole limpet)

LBL - Layer-by-layer

LHB - Sangue de cavalo lisado

LNLS - Laboratório Nacional Luz Síncrotron

LSI - Intensidade de espalhamento de luz

MALDI-TOF-MS - Do inglês “matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry” ou ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo

MBC - Concentração bactericida mínima

mega-Hc - Mega hemocianina

Mg - Magnésio

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MIC - Concentração inibitória mínima

MM - Massa molecular

MOPS - Ácido morfolinopropanossulfônico

MS - Espectrometria de massa

N₂ - Nitrogênio

O₂ - Oxigênio

Oxi-Hc - Hemocianina oxigenada

PBS - Tampão fosfato

pH - Potencial hidrogeniônico

Phe - Fenilalanina

pI - Ponto isoelétrico

PO - Fenoloxidase

PPAE - Enzima ativadora de profenoloxidase

pro-PO - prófenoloxidase

R_H - Raio hidrodinâmico

R_{tH} - Hemocianina de *Rapana thomasi*

R_{vH} - Hemocianina de *Rapana venosa*

SAXS – Espalhamento de raios X de baixo ângulo

SB - Tampão estabilizador

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SEC - Cromatografia de exclusão de tamanho

SV - Velocidade de sedimentação

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão

ToF - Tecnologia do tempo de voo

Trp - Triptofano

Tyr - Tirosina

UFC - Unidades formadoras de colônia

V_{bar} - Volume parcial específico

λ - Comprimento de onda

$\lambda_{\text{máx}}$ - Comprimentos de onda dos máximos de absorção

ω - Velocidade angular

Sumário

1. REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1 Hemocianina	15
1.2 Hcs de Moluscos.....	21
1.3 Hcs de Artrópodes	24
1.4 Importância biotecnológica das Hcs.....	28
1.5 Camarões do gênero <i>Macrobrachium</i>	30
1.6 Técnicas analíticas.....	31
1.6.1 MALDI-TOF-MS	31
1.6.2 AUC	35
1.6.3 Absorção ótica	39
1.6.4 Emissão de fluorescência	40
1.6.5 LSI	42
2. OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo Geral	43
2.2 Objetivos Específicos.....	43
3. METODOLOGIA.....	44
3.1 Extração	44
3.2 Purificação	45
3.3 Eletroforese monodimensional SDS-PAGE	46
3.4 Experimentos de espectrometria de massas MALDI-TOF-MS	46
3.5 Análises de AUC	47
3.6 Análises espectroscópicas.....	48
3.7 Ensaio de atividade biológica da HcMac nativa	49
3.8 Ensaio de atividade fenoxidase (PO)	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Purificação	51
4.2 Eletroforese monodimensional SDS-PAGE	55
4.3 Análises dos espectros de MALDI-TOF-MS	56
4.4 Análises dos dados de AUC	57
4.5 Análises espectroscópicas da HcMac nativa em função do pH.....	59
4.6 Análises da HcMac em função da concentração de ureia nos valores de pH 5,0 e 7,0	65
4.7 Análises HcMac em função da concentração SDS nos valores de pH 7,0 e 5,0	71
4.8 Ensaio de atividade biológica.....	76

5. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	83

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Hemocianina

A hemocianina (Hc) é uma hemoproteína respiratória azul, que está presente na hemolinfa de organismos invertebrados (cerca de 50 – 90%) como moluscos (Filo Mollusca) e artrópodes (Filo Arthropoda), alcançando em algumas espécies concentrações superiores a 100 mg.mL⁻¹. A Hc possui alta estabilidade oligomérica frente a condições extremas de temperatura, entre -20^o a 90^o C, atua de maneira eficiente como carreador de oxigênio, defesa imunológica, controle hormonal e ecdise (PAUL; PIROW, 1998; JAENICKE et al., 1999; GLAZER et al., 2013; COATES; NAIRN, 2013; VOET et al., 2014).

As Hcs formam grandes agregados com massas moleculares na faixa de 4,5 × 10⁵ Da a 43,4 × 10⁶ Da (HERSKOVITS; HAMILTON, 1991) e compostos de diferentes subunidades estruturais/funcionais. Apesar das notáveis diferenças em suas estruturas terciárias e quaternárias, a estrutura do sítio ativo em Hcs de moluscos e artrópodes é semelhante.

Em ambos os casos, cada íon de cobre é ligado por três átomos nitrogênicos (N) e por 3 resíduos de histidina (SPINOZZI, 2005). Entre os dois íons de cobre, uma molécula de oxigênio é ligada de forma reversível (Figura 1). Este centro de cobre tipo 3 também está presente em outras proteínas como tirosinases, catecoloxidases e fenoloxidases, e assume-se que as Hcs evoluíram a partir de proteínas ancestrais aglutinantes de oxigênio, como as tirosinases (TODOROVSKA et al., 2021).

Hcs de artrópode e molusco desempenham a mesma função fisiológica ligada ao transporte circulatório de di-oxigênio para os tecidos. Entretanto, a arquitetura molecular dos agregados, bem como o tamanho das unidades estruturais e funcionais, é bastante diferente nas Hcs dos dois filos (STOEVA et al. 2001).

As Hcs desempenham uma importante função biológica devido à sua capacidade de ligação reversível de oxigênio molecular em um local ativo que contém um centro de cobre binuclear (SCHÜTZ et al., 2001). Assim, como a hemoglobina nos vertebrados, as Hcs são moléculas multiméricas e cada subunidade (artrópodes) ou unidade funcional de uma subunidade (moluscos) se liga ao oxigênio (TODOROVSKA et al., 2021).

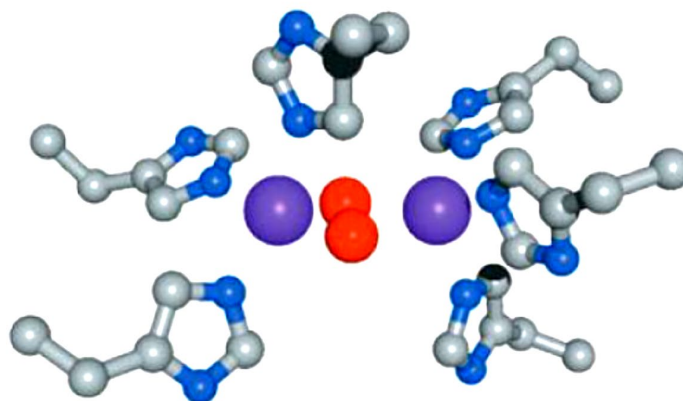


Figura 1 - Modelo de sítio de ligação da hemocianina de caranguejo-ferradura *Limulus polyphemus* (*L. polyphemus*). Os átomos em cinza representam os carbonos, o nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e o cobre em roxo. O complexo é incolor, e torna-se azul quando se liga ao O₂.

Fonte: Voet et al. (2014).

Em geral as Hcs possuem um ponto isoelétrico (pI) ácido (em torno de pH 5,7) (LEE et al., 2004), e por isso em pH 7,0 a superfície eletrostática está carregada, predominantemente, com cargas negativas. Este fato facilita a hidratação e solubilidade da Hc na hemolinfa, minimiza a interação entre as próprias moléculas de hemocianinas com outras proteínas e as interações com superfícies carregadas negativamente no corpo, como o glicocálice das células em contato com a hemolinfa (JAENICKE; DECKER, 2003). Vale salientar que Hc é sintetizada no hepatopâncreas em crustáceos, secretada por células especializadas (cianócitos) em quelicerados e rigocitos em moluscos (BEUERLEIN et al., 2004; WARD et al., 2010; KUHN-NENTWIG et al., 2014).

A Hc existe em duas formas diferentes: a deoxi-Hc, que é incolor e contém um par de cobre [Cu(I) Cu(I)] e a oxi-Hc que apresenta coloração azul (Figura 2) e formulada como [Cu(II) O₂ Cu(II)], que reflete a transferência de elétrons de Cu(I) para o di-oxigênio (SOLOMON et al., 1992).

Uma das diferenças da hemoglobina dos vertebrados para a Hc é o fato de esta ser um pigmento azulado, pois em vez de ferro, possui cobre em seu sítio ativo, ficando azulado ao reagir com o oxigênio e fica incolor quando livre do oxigênio (COATES; NAIRN, 2014).

Os estudos cristalográficos de raio-X da deoxi-Hc da lagosta *Panulirus interruptus* (VOLBEDA; HOL, 1989), as formas deoxi-Hc e oxi-Hc do caranguejo-

ferradura *Limulus polyphemus* (HAZES et al., 1993; MAGNUS et al., 1994) e a estrutura cristalina da unidade funcional da Hc do polvo gigante do Pacífico *Octopus dofleini* (CUFF et al., 1998) mostraram uma imagem detalhada do sítio ativo da hemoproteína, que está profundamente dentro da matriz proteica e vários resíduos hidrofóbicos, incluindo Triptofanos (Trp), estão envolvidos na bolsa do sítio ativo (centro di-cobre). Foi proposto que tais resíduos poderiam contribuir para estabilizar o núcleo hidrofóbico da proteína (SCHÜTZ et al., 2001).

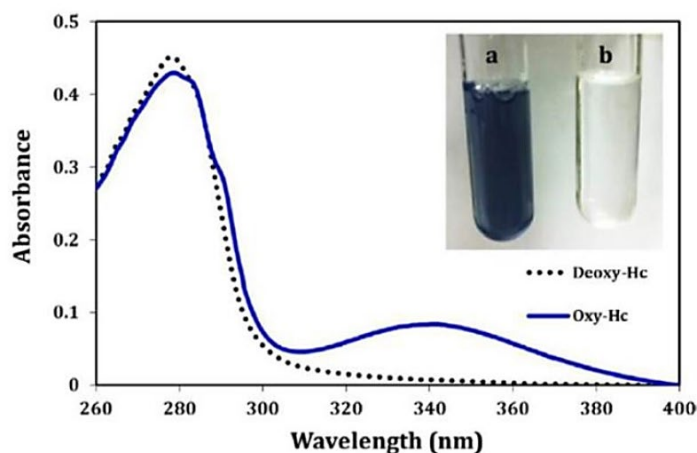


Figura 2 - Espectro de absorção de 0,3 mg.mL⁻¹ da Hc de *L. polyphemus* em 100 mmol.L⁻¹ de tampão Tris-HCl, pH 7,5. O pico de absorbância em torno de 340 nm observado para Hc com a ligação de di-oxigênio está em contraste com o espectro de Hc desoxigenada. a) Uma alíquota de hemolinfa de caranguejo ferradura (azul) oxigenada (contendo 80 mg.mL⁻¹ de Hc). b) Uma alíquota de hemolinfa desoxigenada (clara). A desoxi-hemocianina foi preparada usando diálise. Oxi-Hc em Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 7,5 foi dialisada contra Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 7,5 contendo EDTA 20 mmol.L⁻¹, overnight a 4° C.

Fonte: Adaptado de Coates e Nairn (2014).

Para compreender a definição estrutural dos conformadores de alta e baixa afinidade que estão envolvidos nas propriedades cooperativas de ligação de O₂ destas Hcs de artrópodes e moluscos, a estrutura das formas desoxigenadas (deoxi-Hc) e oxigenadas (oxi-Hc) na presença de efetores alostéricos foi estudada comparativamente por meio de cristalografia de raios-X (HAZES et al., 1993; MAGNUS et al., 1994), espectroscopia de absorção de raios X (SABATUCCI et al., 2002) e dispersão de raios X de baixo ângulo (SAXS) (HARTMANN et al., 2001; HARTMANN; DECKER, 2004;).

O resultado envolve mudanças conformacionais que ocorrem no sítio ativo da hemoproteína, bem como da estrutura terciária e quaternária. Acredita-se que um importante ponto para a mudança de afinidade seja a mudança na distância entre o comprimento de ligação Cu-Cu que diminui de 4,6 Å em deoxi-Hc para 3,6 Å em oxi-Hc (MAGNUS et al., 1994), enquanto as primeiras distâncias médias de ligação do complexo imidazol-cobre (N_{ϵ}^2 -Cu) são essencialmente mantidas (SABATUCCI et al., 2002). Isto se correlaciona com as notáveis semelhanças existentes entre as proteínas dos artrópodes e moluscos, no nível tanto da sequência de aminoácidos quanto da estrutura terciária, como resultado de sua peculiar trajetória evolutiva (DECKER; TERWILLIGER, 2000).

As Hcs têm demonstrado múltiplos papéis associados a processos fisiológicos e imunológicos em invertebrados. Como exemplos pode-se citar: muda (ADACHI et al., 2005a; 2005b), precursor de PAMs (Peptídeos antimicrobianos) de amplo espectro (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2001; LEE et al., 2003), produção de radicais de oxigênio (JIANG et al., 2007), aglutinar/opsonizar microrganismos patogênicos (YAN et al., 2011) e mais notavelmente, atividade fenoloxidase (PO) induzível, denominada atividade PO derivada da hemocianina (Hc-*d* PO) (DECKER; JAENICKE, 2004; COATES et al., 2011).

Em relação à resposta imune, o estímulo da Hc, também chamada de profenoloxidase (proPO), em PO é regulado por uma serino-protease, chamada enzima ativadora de profenoloxidase (PPAE), que é acionada pelos componentes da parede celular (lipopolissacarídeos, -1,3-glucanos ou peptidoglicanos) de bactérias ou fungos (JIANG et al., 1998; LEE et al., 1998; SATOH et al., 1999). Embora a conversão da proPO em PO supostamente ocorre da mesma maneira que se observa no animal vivo, e possa induzir o desenvolvimento de manchas negras durante o armazenamento do animal congelado, pouco se sabe sobre o mecanismo preciso (ADACHI et al., 2001).

A PO é uma proteína de cobre, com ação enzimática (derivada da Hc presente na hemolinfa do animal) que é amplamente distribuída em invertebrados. Esta enzima é expressa a partir de seus hemócitos como seu precursor, proPO, e funciona em várias fases do organismo vivo, tais como esclerose, pigmentação, cura de feridas em cutículas, e reações de defesa (SUGUMARAN, 1996; SÖDERHÄLL et al., 1996; ASHIDA; BREY 1997).

A PO de hemócitos, portanto, tem sido considerada até agora como um fator chave no desenvolvimento de manchas negras em crustáceos congelados durante o armazenamento. Para confirmar esta relação causal, Adachi et al. (1999a) purificaram e caracterizaram o precursor desta enzima (proPO) a partir de hemócitos de camarão kuruma. Observaram que a PO de hemócitos é uma proteína instável, que se agrega facilmente e é inativada em poucos dias, mesmo sob condições refrigeradas abaixo de 4° C.

Por outro lado, a PO está presente em concentrações muito menores na hemolinfa e é mais sensível à desnaturação termal (LIU et al., 2006; GARCIA-CARRENO et al., 2008). As enzimas PO e a cascata de ativação proPO associada desempenham um papel essencial na imunidade aos invertebrados, entretanto, pensa-se que as enzimas PO são a principal causa da hiperpigmentação (MARTINEZ-ALVAREZ et al., 2008).

Hc de crustáceos, moluscos e queliceratos podem ser convertidas de uma proteína transportadora de oxigênio para uma proteína enzimática exibindo atividade PO *in vitro* (DECKER et al., 2007). Esta Hc-d PO supostamente é responsável pela cura de feridas, infecções e na imunidade inata, *in vivo*, sugerindo que a mudança de Hc transportadora de oxigênio para Hc-d PO *in vivo* seja mediada por fatores similares aos envolvidos na cascata de ativação da proPO (NAGAI; KAWABATA, 2000; NAGAI et al., 2001; CERENIUS et al., 2008; COATES et al., 2011). Em alguns artrópodes, a atividade da PO foi atribuída à ativação de proPO, ou uma combinação de ativação de proPO e Hc-d PO (WRIGHT, 2012).

As PO abrangem tanto as tirosinases quanto as catecoloxidasas, as tirosinases catalisam a hibridação dos monofenóis e sua posterior oxidação, enquanto as catecoloxidasas catalisam somente a etapa de oxidação (ROLFF et al., 2011). As Hc-d POs caracterizadas demonstraram atividade de tirosinase e catecoloxidase (DECKER; RIMKE, 1998; MORIOKA et al., 2008; NILLIUS et al., 2008).

Em relação as caracterizações biofísicas, as Hcs podem perder sua estrutura quaternária sob condições não fisiológicas (IDAKIEVA et al., 2020). As propriedades de associação/dissociação das Hcs de alguns moluscos e artrópodes, junto com a estabilidade conformacional em diferentes condições

físicas (por exemplo, temperatura, pH e etc.) e/ou agentes químicos foram estudados (DOLASHKA et al., 1996; TODINOVA et al., 2018).

O estado de equilíbrio da proteína nativa deve, portanto, ser considerado como representante de um delicado equilíbrio entre um grande número de interações fracas, cada uma das quais sensível à temperatura e ao estado do solvente circundante (ou seja, pH, força iônica, presença de solutos que quebram a ligação de hidrogênio, como a ureia, e presença de compostos anfífilos que afetam o equilíbrio das interações hidrofóbicas e hidrofílicas) (DOLASHKI et al., 2019).

A desnaturação das Hcs pode ser provocada de muitas maneiras, incluindo a desnaturação térmica (pelo aumento da temperatura), a desnaturação pela mudança de pH e a desnaturação química. Por isso, tais estudos necessitam ser muito bem explorados e o uso de diferentes técnicas biofísicas pode ser bastante interessante para se compreender os efeitos sobre a estrutura quaternária das proteínas oligoméricas (isto é, dissociação inicial) e sobre as estruturas terciárias e secundárias (isto é, desdobramento das subunidades) (DOLASHKI et al., 2019).

Ao aumentar o pH do meio para 9,0 e/ou remover íons metálicos bivalentes (como Ca^{2+} , Mg^{2+}), a molécula Hc se dissocia em subunidades, sem perder a capacidade de ligar o oxigênio molecular de forma reversível (VAN HOLDE; MILLER, 1995; PREAUX; GIELENS, 2010).

Idakieva et al. (2020) analisaram o processo de dissociação/reassociação da Hc de caracóis de jardim *Helix lucorum* (HIH). Após a diálise noturna contra tampão 130 mmol.L^{-1} Gly-NaOH (pH 9,6), a análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da HIH dissociada mostrou estruturas desorganizadas. Ao alterar as condições, utilizando diálise contra o tampão estabilizador (SB) em pH 7,2, contendo 20 mmol.L^{-1} de CaCl_2 e 20 mmol.L^{-1} de MgCl_2 , as subunidades estruturais obtidas foram em sua maioria reassociadas para formar didecâmeros e multicâmeros.

Além disso, as Hcs podem facilmente dissociar-se em pH alcalino (por exemplo, pH 9,6) em subunidades funcionais e reassociar-se a um pH quase neutro (por exemplo, pH 7,5) em sua estrutura quaternária original. Para isso essas conformações necessitam da presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (MARKL, 2013).

Importante enfatizar que a identificação do repertório de subunidades e disposição/caracterização de Hcs pode melhorar a compreensão da evolução das espécies e o papel da diversidade de sequências na montagem e função dos oligômeros de ordem superior, especialmente em resposta às mudanças ambientais (TODOROVSKA et al., 2021). E para garantir a qualidade e a eficácia da glicoproteína para usos terapêuticos, sua estrutura molecular e estabilidade térmica são características chave que precisam ser elucidadas (DOLASHKI et al., 2019).

1.2 Hcs de Moluscos

A estrutura quaternária básica da Hc de molusco é decamérica, geralmente com pesos moleculares entre 4,0 e 9,0 MDa, na forma de um cilindro oco de 30 - 38 nm de diâmetro e 15 -18 nm de altura, que contém 10 subunidades com sequência idêntica e com massa molecular entre 330 - 450 kDa (VAN HOLDE; MILLER, 1992; 1995; MILLER et al., 1998; MARKL, 2013; COATES e NAIRN et al., 2014; DECKER et al., 2018). Cada subunidade tem 7 ou 8 unidades funcionais (FUs) globulares diferentes, com massa molecular (MM) de 50 - 55 kDa (VAN HOLDE; MILLER, 1995; MARKL, 2013) e cada FU contém um sítio ativo de di-cobre, capaz de ligar de forma reversível uma molécula de oxigênio (VAN HOLDE; MILLER, 1995; DECKER et al., 2018), como mostra a Figura 3. Nos últimos anos, houve um progresso na investigação estrutural da Hc de moluscos (LIEB et al., 2010; COATES; NAIRN et al., 2014; GATSOGIANNIS et al., 2015).

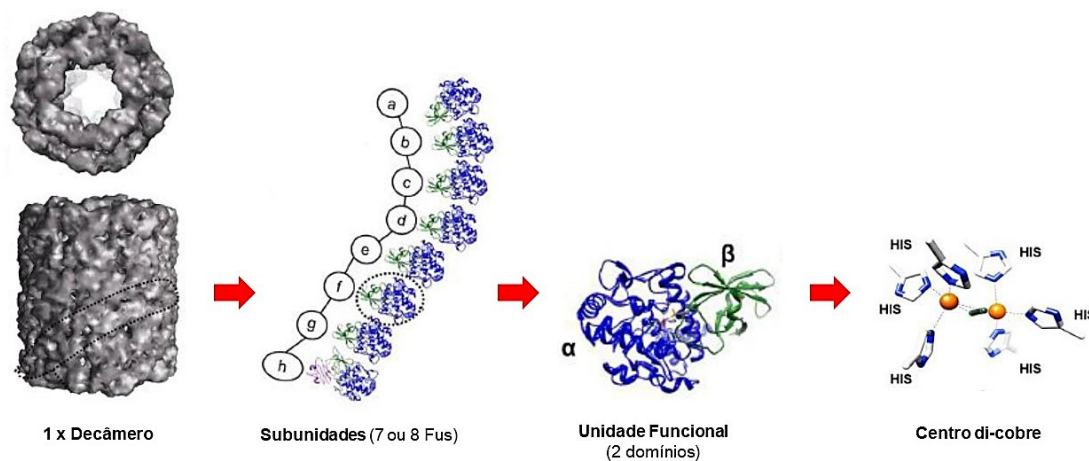


Figura 3 - Organização estrutural de hemocianinas de moluscos. Os átomos de cobre são representados pela cor laranja.

Fonte: Adaptado de Coates e Nairn (2014).

A primeira sequência completa publicada de uma subunidade estrutural de Hc de molusco, foi a do *Octopus dofleini* (MILLER et al., 1998). Além disso, a estrutura cristalográfica da unidade funcional *Odg* a partir da mesma proteína respiratória foi determinada em 2,3 Å de resolução (CUFF et al., 1998).

A maioria das Hcs de moluscos são glicoproteínas e possuem potenciais imunoterapêuticos, incluindo efeitos antineoplásicos, antivirais e antibacterianos (LAMM, 2003; DOLASHKA et al., 2010; DOLASHKA et al., 2011; ARANCIBIA et al., 2012; ANTONOVA et al., 2014; COATES; NAIRN et al., 2014; DOLASHKA et al., 2016). Algumas Hcs de moluscos têm um potencial significativo para o desenvolvimento de novos medicamentos (LAMM, 2003; ZANJANI et al., 2018).

A literatura relata que as Hcs de *Rapana venosa*, *Helix lucorum* e *Helix aspersa* apresentam atividades antitumorais e antimicrobianas (DOLASHKA et al., 2010; DOLASHKA et al., 2011; ANTONOVA et al., 2014; DOLASHKA et al., 2016). A Hc de *Haliothis tuberculata* (HtH) contém peptídeos antimicrobianos e pode atuar como fonte de peptídeos anti-infecciosos (ZHUANG et al., 2015).

Foi encontrada em gastrópode, a incomum Hc tridecamérica em caramujos ceritóides de água doce, denominadas "mega-Hc" (LIEB et al., 2010). A mega-Hc com massa molecular de 13,5 MDa está entre os maiores transportadores de oxigênio conhecidos encontrados na hemolinfa de alguns caramujos (LIEB et al., 2010; COATES; NAIRN et al., 2014; GATSOGIANNIS et al., 2015).

As mega-Hcs de caramujos ceritóides são uma exceção, pois sua estrutura interna apresenta um arranjo mais complexo (COATES; NAIRN et al., 2014). As subunidades da Hc destes moluscos estão entre as maiores cadeias polipeptídicas encontradas na natureza (MARKL, 2013), tipicamente compostas de cerca de 400 resíduos de aminoácidos com diferentes sequências e padrões genômicos e massas moleculares de 330 - 450 kDa, dependendo da espécie (VAN HOLDE; MILLER, 1995; DECKER et al., 2007).

O número de isoformas de Hc presentes nas espécies de moluscos varia entre 1 e 3 (VAN HOLDE; MILLER, 1995; DECKER et al., 2007; MARKL, 2013). Enquanto os gastrópodes marinhos têm uma ou duas isoformas de Hc estrutural e funcionalmente distintas, três isoformas de Hc (β -HIH, α D-HIH e α N-HIH) foram relatadas para *Helix lucorum* e *Helix aspersa* (VELKOVA et al., 2010; ANTONOVA et al., 2014).

Uma característica adicional das estruturas de Hc de moluscos é a presença de carboidratos ligados à sua estrutura, que desempenham papéis fundamentais em sua organização e sua eficácia imunológica (VAN HOLDE; MILLER, 1995; DECKER et al., 2007). As Hcs de gastrópodes são glicoproteínas com um teor de carboidratos mais elevado de cerca de 9% (p/p) em relação as Hcs de artrópodes e podem conter monossacarídeos incomuns, tais como uma hexose metilada (por exemplo, O-metilmannose e O-metilgalactose), β (1,2)-xilose ligada, α (1,3)-fucose ligada, α (1,6)-fucose ligada ou ácido hexurônico (VAN HOLDE; MILLER, 1995; DOLASHKA et al., 2010; DOLASHKA et al., 2011).

Em gastrópodes e bivalves a estrutura quaternária típica da Hc nativa é um didecamero cilíndrico, formado pela montagem face a face de dois decâmeros (VAN HOLDE; MILLER, 1995). Várias Hcs gastropodais são heterogêneas, pois consistem de duas isoformas de subunidades imunologicamente distintas que se expressam de modos diferentes (STREIT et al., 2005).

A Hc dos gastrópodes *Megathura crenulata* (GEBAUER et al., 1994), *Haliotis tuberculata* (LIEB et al., 2000), e *Rapana venosa* (DOLASHKA-ANGELOVA et al., 2000) possuem duas formas homodecaméricas nativas distintas cada, contendo uma das duas isoformas da subunidade (DOLASHKI 2008).

DOLASHKI et al. (2008), estudou a influência da temperatura e pH na estabilidade da Hc do molusco *Rapanna venosa* e constatou por análises de CD que ocorrem mudanças iniciais relativamente pequenas (222 nm) a altas temperaturas (45 °C), indicando que muitos elementos da estrutura secundária são preservados, especialmente em pH neutro e até mesmo em temperaturas extremamente altas.

O interesse em estudar as Hcs de moluscos está bem estabelecido, baseado principalmente nas propriedades imuno-estimuladoras únicas destas hemoproteínas; estes biopolímeros extracelulares são glicoproteínas de cobre e transportadoras de oxigênio, formando agregados livremente dissolvidos na hemolinfa dos moluscos com MM extremamente elevada (comparável em tamanho aos ribossomos ou pequenos vírus) e estrutura quaternária complexa (STERNER; DECKER, 1994; HARRIS et al., 2000). Elas têm sido intensamente estudadas por sua estrutura, função e evolução, e por aplicações imunológicas e clínicas (VAN HOLDE et al. 1992; VAN HOLDE; MILLER 1995; HARRIS; MARKL, 1999).

1.3 Hcs de Artrópodes

As Hcs de Artrópodes são hexâmeros (1 × 6) ou múltiplos de hexâmeros (2×hexâmeros, 4×hexâmeros, 6×hexâmeros ou 8×hexâmeros) constituídos por subunidades estruturais de aproximadamente 75 kDa (STOEVA et al., 2001). O hexâmero básico é construído com seis subunidades em forma de feijão localizadas nos cantos de um antiprisma trigonal e cada subunidade é uma única cadeia polipeptídica que contém um local de ligação de oxigênio di-nuclear (STOEVA et al., 2001). O local ativo consiste em dois átomos de cobre não equivalentes (CuA e CuB), cada um coordenado por três grupos imidazólicos de resíduos de histidina (VOLBEDA; HOI, 1989).

A composição de subunidades e sua disposição são tipicamente táxon-específico e pode ter sido conservada em alguns táxons de artrópodes por vários milhões de anos (BURMESTER, 2013). Cada Hc de artrópode consiste em três domínios (Figura 4): o domínio I contém de cinco a seis α -hélices, o domínio II contém um pacote de quatro α -hélices e compreende o centro di-cobre e o domínio III são sete folhas β (VAN HOLDE et al., 2001; REHM et al., 2012).

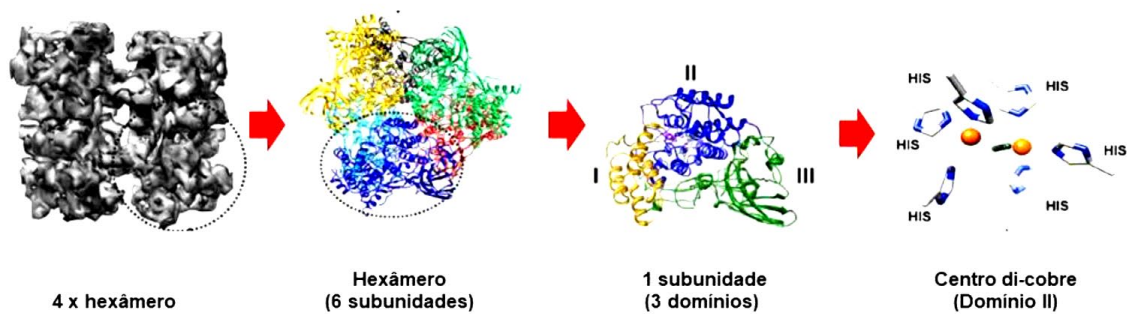


Figura 4 - Organização estrutural de hemocianinas de artrópodes. (Domínio II). Apresenta o centro di-cobre com seis resíduos de histidina conservados. Os átomos de cobre são representados pela cor laranja.

Fonte: Adaptado de Coates e Nairn (2014).

A organização tridimensional da deoxi-Hc de *Panulirus interruptus* foi determinada em uma resolução de 3,2 Å por cristalografia de raios X (GAYKEMA et al., 1984). Os cristais utilizados para estes estudos continham subunidades *a* e *b* em quantidades iguais. O modelo revelou que cada subunidade é dobrada em três domínios, e que o segundo domínio contém o sítio de cobre di-nuclear.

A maioria das Hcs dos crustáceos malacostracos formam 1×hexâmero ou 2×hexâmeros, com exceção dos talassinídeos *Callinassa californiensis* (MARKL; DECKER, 1992) e *Upogebia pusilla* (MICETIC et al., 2010) que possuem 4×hexâmeros. Estas Hcs mostram um elevado grau de variabilidade, por exemplo, as subunidades podem estar presentes apenas em algumas etapas de seu desenvolvimento ou sob certas condições fisiológicas (DECKER et al., 2004). Além disso, os grupos de subunidades podem diferir entre as espécies estreitamente relacionadas ou mesmo dentro das populações (DECKER et al., 2004).

Dados detalhados de cristalografia de raios X e microscopia eletrônica 3D mostraram que a estrutura quaternária da Hc de artrópode é baseada no hexâmero (1×hexâmero) que contém seis subunidades heterogêneas de cerca de 75 kDa cada (aproximadamente 660 aminoácidos) e é conservada dentro de todas as Hcs de artrópode. Tal estrutura foi observada em lagostas *P. elephas* e *P. interruptus* (MEISSNER et al., 2003), assim como em outros caranguejos. Nas espécies de artrópodes, os hexâmeros de Hc podem se associar para formar multihexâmeros (2×hexâmeros, 3×hexâmeros, 6×hexâmeros e 8×hexâmeros)

de massa molecular superior (MARKL; DECKER, 1992; VAN HOLDE; MILLER 1995).

Em *Scolopendra subspinipes* e *Scolopendra viridicornis* pertencentes ao subfilo Myriapoda, a Hc é composta de 3×hexâmeros e 6×hexâmeros, respectivamente (RICILUCA et al., 2020), enquanto que no *Limulus polyphemus* (subfilo Helicerata) é composta de 8×hexâmeros (MARTIN et al., 2007).

Os estudos detalhados sobre a estrutura das hemoproteínas de artrópodes mostram que a subunidade monomérica da Hc é composta de três domínios distintos: domínios N-terminal, M-terminal e C-terminal (LINZEN et al., 1985). Os domínios N-terminal e C-terminal são mais variáveis em sequência do que o domínio M e estão envolvidos na ligação de carboidratos (TODOROVSKA et al., 2021).

A presença do cobre no sistema interno dos crustáceos é fundamental para o seu funcionamento, havendo necessidade de um nível adequado na hemolinfa, pois ele não é apenas um elemento vestigial, mas essencial, sendo também potencialmente tóxico para os animais (COATES; NAIRN, 2014).

Muitos estudos *in vitro*, com mais de 40 espécies de invertebrados, evidenciam que as Hcs possuem atividade fenoxidase latente, podendo ocasionar a sua conversão em proteínas enzimáticas com função imunológica (ADACHI et al., 2003; BAIRD et al., 2007; KUBALLA et al., 2011; COATES et al., 2013). A Hc pode ser convertida em uma enzima tipo PO através de duas formas principais de conversão: a) tratamento proteolítico com proteases (tripsina ou derivado de micróbios) e b) através de perturbações na estrutura oligomérica da proteína pela ação de agentes caotrópicos como detergentes, solventes, sais e fosfolípidios. O surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) é comumente usado em baixas concentrações (abaixo de 1,0 mmol.L⁻¹) para estimar a atividade enzimática de PO (DECKER et al., 2001; DECKER E JAENICKE, 2004; BAIRD et al., 2007; GOLDFEDER et al., 2013).

Dessa maneira, em diferentes espécies de crustáceos têm sido relatados que a Hc gera peptídeos antimicrobianos (PAMs) em resposta ao ataque microbiano (PETIT, 2016). Dentre os estudos destacam-se os de Destoumieux-Garzon et al. (2001) que isolaram dois fragmentos peptídicos presentes na hemolinfa dos camarões *Penaeus stylirostris* e *Penaeus vannamei* demonstrando atividade antifúngica na sequência identificada próxima da região

C-terminal da proteína; Lee et al. (2003) isolaram um potente peptídeo antibacteriano de 16 resíduos de aminoácidos, Astacidin 1, extraído da Hc do lagostim de água doce *Pacifastacus leniusculus*; Zhang et al. (2004) obtiveram anticorpos do camarão *Penaeus monodon* infectado com a síndrome da mancha branca (WSSV), através da purificação de peptídeos acoplados a partículas virais (73 kDa e 75 kDa) que foram subsequentemente identificadas como derivados de Hc; Liu et al. (2018) mostraram a eficiência do peptídeo p11 derivado da hemocianina de *P. vannamei* como inibidor da proliferação de células carcinogênicas.

O camarão tigre *P. monodon* (Crustacea, Decapoda) é um dos maiores invertebrados da família Penaeidea. Este organismo vive em áreas com condições tropicais e subtropicais e está amplamente distribuído em toda a região Indo-Pacífico. *P. monodon* é um habitante marinho de importância comercial. Ele cresce rapidamente e tolera mudanças na salinidade e na temperatura ambiental (ELLERTON; ANDERSON, 1981; CHEN et al., 1994a).

Embora a estrutura e função das Hcs crustáceos estão sendo investigadas, as informações estruturais sobre Hcs de Penaeidea são ainda limitadas. Estudos sobre as mudanças das proteínas e aminoácidos livres na hemolinfa de *P. monodon* (CHEN et al., 1994a) e *Penaeus japonicus* (CHEN et al., 1994b), bem como sobre a síntese de Hc em *Penaeus semisulcatus* (KHAYAT et al., 1995) foram publicadas. Hcs foram isoladas da hemolinfa de *P. monodon* (ELLERTON; ANDERSON, 1981) e *P. vannamei* (camarão branco) (FIGUEROA-SOTO et al., 1997) e caracterizadas.

Os crustáceos marinhos são vulneráveis ao desenvolvimento de manchas negras em seus corpos e depois descolorem durante o congelamento no armazenamento. Esta descoloração, chamada "desenvolvimento de manchas negras" é atribuída à melanose resultante da oxidação enzimática dos fenóis e seus derivados pela PO (YAN; TAYLOR, 1991; ALI et al., 1994ab; TAYLOR, 1995).

Clonagens moleculares de proPO foram realizadas em 4 espécies de artrópodes e suas sequências de aminoácidos deduzidas mostraram ser altamente similares às da Hc (ASPAN et al., 1995; FUJIMOTO et al., 1995; HALL et al., 1995; KAWABATA et al., 1995). Nos crustáceos, esta proteína transportadora/armazenadora de oxigênio é expressa a partir do

hepatopâncreas e localizada em concentrações bastante elevadas no plasma, compreendendo 90 a 95% da proteína plasma total (VAN HOLDE; MILLER, 1995), enquanto apenas uma quantidade trivial de PO existe nos hemócitos.

Compreender os mecanismos de ação e participação da Hc nos processos fisiológicos dos crustáceos pode trazer avanços na carcinicultura e servir de fonte para potentes peptídeos bioativos.

1.4 Importância biotecnológica das Hcs

Vários aspectos de suas peculiaridades estruturais-funcionais fazem das Hcs moléculas importantes para abordar problemas relevantes da biologia estrutural, incluindo o reconhecimento molecular entre subunidades, interações proteína-água ou regulamentação alostérica (DOLASHKA-ANGELOVA et al. 2007).

A Hc do molusco lapa de fechadura (*Megathura crenulata*), keyhole limpet (KLH), é aplicada com sucesso na medicina. Assim, a KLH é amplamente utilizada em laboratórios e clínicas como estimulante imunológico (JURINCIC et al., 1988), para vacinas contra a AIDS (KAHN et al., 1992) e para uma vacina profilática para prevenir o abuso da cocaína (BAGASRA et al., 1992), e também pode ser um agente imunoterapêutico eficaz contra o câncer de bexiga (JURINCIC et al., 1988; FLAMM et al., 1990). Sua estrutura protéica e comportamento de desmontagem/remontagem foram amplamente estudados (ORLOVA et al. 1997; SOHNGEN et al. 1997; HARRIS et al. 1998, 2000; GEBAUER et al. 1999b, 2002; MOUCHE et al., 2003).

O campo da imunologia celular forneceu muitas informações biomédicas relevantes sobre a KLH e levou à expansão do uso da KLH em imunologia experimental e clinicamente como agente imunoterápico, sendo comparada como igual ou superior à vacina BCG e com menos efeitos colaterais (HARRIS; MARKL, 1999; RIGGS et al., 2002; SUMINOE et al., 2008; BETTING et al., 2009).

Enquanto a resposta imunológica à KLH foi frequentemente atribuída à participação de carboidratos, em vez de apenas proteínas, a cadeia de polipeptídios de oito unidades funcionais globulares que constituem a subunidade alongada KLH e a estrutura quaternária altamente organizada da

molécula nativa poderiam criar um andaime no qual vários epítomos de carboidratos seriam inicialmente disponibilizados para o sistema imunológico (VARSHNEY et al., 2010).

O espaçamento estéreo ideal dos resíduos de açúcar poderia potencializar a resposta estimulante potente observada, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Prevê-se que estas cadeias laterais de carboidratos se projetem a partir da superfície da molécula KLH, bem como das subunidades, proporcionando assim imunogenicidade (GEYER et al., 2005; BECK et al., 2007; SANDRA et al., 2007; DOLASHKA-ANGELOVA et al., 2009).

Os primeiros trabalhos mostraram que a KLH é composta de duas subunidades diferentes, KLH1 e KLH2 (MARKL et al., 1991; SWERDLOW et al., 1996). Estas agem como instrumento imunológico amplamente utilizado e promissores portadores de vacinas tumorais (KIM et al., 2007; SABBATINI et al., 2007). A sequência completa de aminoácidos da Hc do molusco *Haliotis tuberculata* (KELLER et al., 1999; LIEB et al., 2000) e ambos KLH1 e KLH2 foram encontrados (LIEB; MARKL, 2004) e foi criado o modelo híbrido de estrutura cryo EM/cristal de KLH1 (ORLOVA et al., 1997; GATSOGIANNIS; MARKL, 2009).

Há muitos relatos na literatura sobre possíveis aplicações das Hcs moluscos na medicina como imunoestimulantes, portadores de vacinas, agentes antivirais, etc. (GESHEVA et al., 2014; GESHEVA et al., 2015; ZANJANI et al., 2018). Recentemente, um estudo relatou um efeito anticâncer significativo das Hcs de caramujos marinhos *Rapana thomasiana* (RtH) e caramujos de jardim *Helix pomatia* (HpH) em um modelo murino de carcinoma do cólon (STOYANOVA et al., 2020). As investigações sobre a Hc isolada dos caracóis de jardim *Helix lucorum* (HIH) demonstraram suas propriedades imunológicas e atividade antitumoral (DOLASHKA-ANGELOVA et al., 2008; DOLASHKA et al., 2011; BOYANOVA et al., 2013).

Estudos evidenciam que as Hcs são versáteis para diferentes aplicações biotecnológicas, uma vez que as mesmas possuem atividade antiviral e antimicrobiana, além de apresentar atividade PO latente quando exposta a condições de estresse. Yang et al. (2013) desenvolveram um sensor eletroquímico a partir da Hc imobilizada numa matriz de celulose e nanopartículas de ouro para quantificação simultânea da hidroquinona e o catecol. Neste estudo, o dispositivo teve uma boa linearidade com limite de

detecção de $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a hidroquinona e $87 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para o catecol.

Recentemente, outro estudo reportou um dispositivo obtido a partir da Hc com alta sensibilidade para o catecol (considerado poluente ambiental pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA e União Européia), de baixo custo e limite de detecção de cerca de $90,8 \text{ nmol.L}^{-1}$ (HARIHARAN et al., 2019). Tais fatos sugerem que esta classe de proteína pode ser utilizada para o desenvolvimento de sensores, para quantificação e detecção de micro poluentes, como agrotóxicos e hormônios.

A questão da formulação de preparações estáveis é de particular importância em vista das possíveis aplicações terapêuticas da Hc. Isto, por sua vez, requer o conhecimento da estrutura e estabilidade das moléculas.

1.5 Camarões do gênero *Macrobrachium*

Camarões do gênero *Macrobrachium* são importantes membros dos sistemas de água doce e estuarino (MUNANSINGHE, 2010). Possuem grande diversidade, apresentando mais de 240 espécies descritas em todo o mundo (DE GRAVE; FRANSEN, 2011). Nas Américas, possui 55 espécies reconhecidas, das quais 17 estão distribuídas no Brasil em bacias do interior, litoral e na Amazônia (PILEGGI; MANTELATTO, 2010).

Da fauna brasileira, apenas três espécies do gênero *Macrobrachium* apresentam interesse econômico e alto potencial de cultivo: *M. acanthurus*, *M. carcinus* e *M. amazonicum* (BERTINI; VALENTI, 2010). As duas primeiras ocorrem nos estuários do Estado de São Paulo, enquanto que a terceira é largamente distribuída em águas interiores nos rios da bacia do Rio Paraná, sendo abundante nas regiões estuarinas do norte e nordeste do país (MAGALHÃES et al., 2005). O *M. acanthurus* é comum na região do Vale do Ribeira e explorado pela pesca artesanal visando o comércio de iscas vivas para a pesca esportiva e consumo humano (BERTINI; VALENTI, 2010) e *M. amazonicum* é largamente explorado na região nordeste e nos estados do Pará e Amapá, tendo importância relevante para a comunidade ribeirinha destas regiões, contribuindo com a economia e com o desenvolvimento da atividade pesqueira (LIMA et al., 2019).

Assim, apesar destas espécies nativas possuírem alto potencial para a aquicultura e de existir a preocupação desde o início da década dos anos 2000 em se criar espécies endêmicas (KUTTY et al., 2000), atualmente o camarão exótico, *M. rosenbergii* é a principal espécie de camarão de água doce cultivada comercialmente no Brasil e no mundo (FAO, 2019).

No entanto, a carcinicultura de água doce sofre muitos surtos de doenças causadas por infecções fúngicas e bacterianas o que reduz drasticamente a produção (CHENG; CHEN, 1998; CHEN et al., 2001; WANG et al., 2012). Portanto, a prevenção de surto de doenças e o estudo de potenciais moléculas antimicrobianas, que poderão ser utilizadas no tratamento de doenças ocasionadas em camarões de interesse econômico, são de primordial importância para sistemas de cultivo. Os camarões não possuem memória imunológica e eles dependem do sistema imunológico inato para a defesa e eliminação de microrganismos (WANG et al., 2012). Muitas moléculas não específicas, incluindo fenoloxidase, peptídeos antimicrobianos, lisozima e lectinas, já foram clonadas e caracterizadas a partir da Hc dos camarões peneídeos *Penaeus vannamei*, *P. japonicus*, *P. monodon* (SELLOS et al., 1997; LEI et al., 2008; SOMBOONWIWAT et al., 2010) e para o caranguejo *Cancer magister* (DURSTEWITZ; TERWILLIGER, 1997).

Desta forma, o presente trabalho possibilitará aprofundar os conhecimentos sobre possíveis diferenças estruturais da HcMac frente a outras Hcs de camarões já estudadas e servir de suporte para futuras aplicações biotecnológicas.

1.6 Técnicas analíticas

1.6.1 MALDI-TOF-MS

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica analítica que visa identificar a quantidade e o tipo dos compostos químicos que existem dentro das moléculas e se baseia na medição da relação massa/carga das amostras analisadas (HOSSEINI; MARTINEZ-CHAPA, 2017). As antigas técnicas de MS aproveitavam a ionização da amostra por bombardeamento do analito com feixes de elétrons. Este método de ionização normalmente resulta na quebra da amostra em milhares de fragmentos carregados (SPARKMAN, 2000). As

moléculas na amostra analisada podiam então ser identificadas através da correlação das massas conhecidas com os padrões resultantes dos fragmentos.

Todavia, nenhuma técnica disponível na época era capaz de preservar as moléculas durante a ionização ou para minimizar a chance de fragmentação (SPARKMAN, 2000). Embora as técnicas convencionais de MS fossem bastante comuns e aplicáveis em muitas áreas diferentes de pesquisa, elas só eram capazes de oferecer "ionização intensa" (HOSSEINI; MARTINEZ-CHAPA, 2017).

Hillenkamp e Karas (1985), dois cientistas da Alemanha, estabeleceram a técnica de ionização suave. Eles descobriram que o aminoácido Alanina (Ala) podia ser facilmente ionizado quando misturado com o aminoácido Trp e irradiado por um pulso de laser de 266 nm, e que outros tipos de peptídeos poderiam ser ionizados após misturados com o mesmo tipo de "matriz" (KARAS et al., 1987). Mais importante ainda, eles descobriram que nesta técnica, as moléculas são protegidas da fragmentação durante o procedimento de ionização pela presença da matriz e por este motivo foi denominada de ionização suave (HOSSEINI; MARTINEZ-CHAPA, 2017).

Karas e Hillenkamp aperfeiçoaram posteriormente a técnica com base no conceito de ionização suave e, como resultado, o primeiro instrumento de ionização de dessorção assistida por laser (MALDI-MS) foi disponibilizado comercialmente no início dos anos 90 (HILLENKAMP; KARAS, 2000). Mais tarde, em 2002, Tanaka ganhou um quarto do Prêmio Nobel de Química por sua contribuição no desenvolvimento da técnica de ionização por dessorção suave para análise espectroscópica de macromoléculas biológicas (MARKIDES; GRÄSLUND, 2002).

No final dos anos 50, antes do nascimento do MALDI-MS, já existia a tecnologia do tempo de voo (ToF); uma técnica na qual íons carregados eram forçados a voar de uma fonte até o detector para que pudessem ser identificados com base no tempo de seu voo até o detector de íons. Mas ToF estava sofrendo com sua baixa resolução e não encontrou sua aplicação nas técnicas de MS. Somente mais tarde, percebeu-se que a combinação da tecnologia MALDI-MS e ToF pode resultar em uma técnica altamente sensível que hoje conhecemos como MALDI-ToF-MS (HOSSEINI; MARTINEZ-CHAPA, 2017).

A análise MALDI-ToF-MS encontrou rapidamente uma variedade de aplicações em muitas áreas científicas diferentes, pois fornece informações essenciais sobre parâmetros importantes como a MM e polidispersão do composto que pode ser utilizado para diversas aplicações tais como o estudo das vias de síntese, verificação dos mecanismos de degradação, medição dos aditivos e impurezas, formulações de produtos e identificação de variações composicionais (HOSSEINI; MARTINEZ-CHAPA, 2017).

Uma das principais aplicações analíticas do MALDI-ToF-MS, na bioquímica é a coleta de impressões digitais em massa de peptídeo, revela a sequência de aminoácidos dos peptídeos com o objetivo de decomposição pós-fonte ou dissociação induzida por colisão de alta energia (HARVEY, 1999; LATTOVÁ et al., 2007; TAJIRI et al., 2009).

A análise de macromoléculas orgânicas na química, tais como catenanas, rotaxanas, dendrinas e polímeros hiperbranqueados, normalmente enfrenta limitações em muitas das técnicas de ionização, pois é difícil produzir íons moleculares a partir de tais microestruturas (HOSSEINI; MARTINEZ-CHAPA, 2017). Utilizando as vantagens da análise de MALDI-ToF-MS, o peso molecular e a estrutura química destes compostos podem ser cuidadosamente analisados (CHIKH et al., 2007; 2008).

O MALDI-ToF-MS pode ser usado para análise de homopolímeros, copolímeros e polímeros misturados (determina o número de fatores-chave que são cruciais em aplicações subsequentes dos polímeros). Na área de microbiologia, pode ser aplicado para identificação de microorganismos como bactérias ou fungos e junto de outras técnicas analíticas é utilizado para diagnóstico de doenças (HOSSEINI; MARTINEZ-CHAPA, 2017).

Em relação ao modo de ação da técnica, o MALDI-TOF-MS introduz a ionização suave das amostras analisadas. Quando o feixe do laser é irradiado para o ponto alvo, onde a amostra é montada, o pulso laser com o objetivo de matriz (e agente ionizante em alguns casos) dissolve e ioniza o analito de interesse de forma indireta e, como resultado, um íon de alta massa pode ser produzido por esta técnica (ionização suave) (HOSSEINI; MARTINEZ-CHAPA, 2017). Para obter uma ionização bem-sucedida da amostra, a matriz escolhida deve ter um coeficiente de absorção considerável no comprimento de onda específico aplicado (WU; ODOM, 1998).

A matriz atua inicialmente como um separador para o analito, pois reduz as forças intermoleculares por um fenômeno chamado isolamento da matriz (WU e ODOM, 1998). Portanto, ela impede a formação de aglomerados dentro do analito, como é mostrado na Figura 5. Após a irradiação a laser, a matriz começa seu papel real na ionização suave da substância a ser analisada absorvendo a maioria da energia do fóton. Conseqüentemente, a matriz preserva a substância a ser analisada da irradiação direta a laser. A energia absorvida leva à excitação da matriz. Através desta excitação, a matriz muda a fase de sólido para gás e uma densa nuvem de gás é gasta na câmara de vácuo. O produto final do analito ionizado se forma como resultado da colisão das moléculas neutras do analito e íons de matriz (WU; ODOM, 1998).

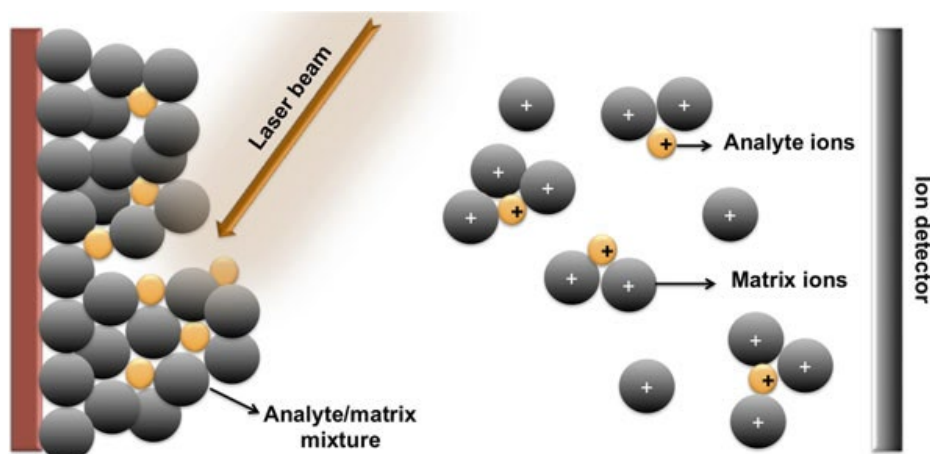


Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de ionização suave da substância a ser analisada.

Fonte: Hosseini e Martinez-Chapa (2017).

Os íons gerados que podem ser íons matrizes, íons de análise ou possivelmente fragmentos ionizados das moléculas de analitos são acelerados e conduzidos para a zona de deriva (Figura 6). Esta região é muito maior em comparação com a zona de ionização ou de aceleração. No final da trajetória de vôo, localiza-se o detector de íons que pode registrar o tempo de vôo e a intensidade dos íons individuais que chegam até o detector de íons. Como se espera, íons mais pesados levam mais tempo para chegar ao detector, enquanto íons mais leves percorrem a mesma distância em menos tempo.

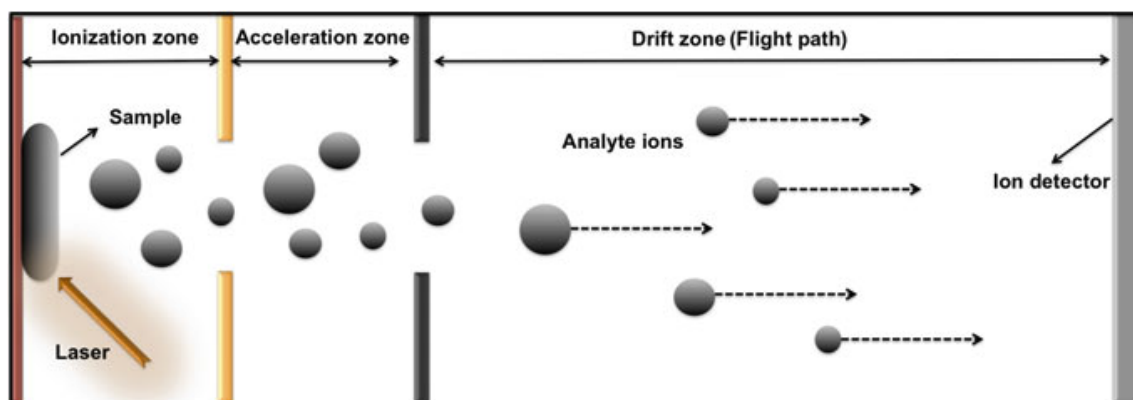


Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de tempo de voo; a mistura de analito e matriz é direcionada pelo raio laser e os íons de analito são acelerados e conduzidos em direção ao detector de íons no final da zona de voo.

Fonte: Hosseini e Martinez-Chapa (2017).

Com base nas informações registradas pelo instrumento, a relação de massa por carga (m/z) pode ser cuidadosamente determinada seguindo a equação abaixo:

$$m/z = 2eE(t/d)^2$$

Nesta equação, m é a massa da molécula ionizada e z é o número de elétrons que foram removidos da molécula, E é a tensão de aceleração, e é a carga elementar, t é o tempo de voo e d é o comprimento da zona de deriva.

1.6.2 AUC

A técnica de ultracentrifugação analítica (AUC - do inglês Analytical Ultracentrifugation), é uma poderosa técnica para estudar o comportamento de macromoléculas em solução, pois pode fornecer informações importantes na caracterização estrutural de proteínas em solução. Através desta técnica é possível determinar a MM de uma macromolécula e obter informações sobre a heterogeneidade do sistema em relação à sua massa, ou seja, de quantas subunidades o sistema é formado e qual a proporção entre elas.

A AUC possibilita determinar se a macromolécula forma agregados e se estes são reversíveis ou irreversíveis. O coeficiente de sedimentação (s), é um parâmetro específico da partícula, sendo utilizado para monitorar mudanças conformacionais de proteínas (LAUE, 2001). Esta técnica é uma ferramenta

importante em muitas áreas tradicionais da bioquímica, biologia molecular, interações de proteína e caracterização de nanopartículas e biomateriais, e no desenvolvimento de condições para aprimoramento da indústria farmacêutica (VOGEL et al., 2002).

A técnica AUC é absoluta, devido ao fato de não necessitar de padrões externos e se baseia em teorias bem fundamentadas da física de movimentos. Quando um objeto está sob centrifugação, é possível caracterizar algumas forças às quais o objeto está submetido. Foi proposta e usada pela primeira vez por Svedberg, onde foi aplicada para demonstrar a homogeneidade de sistemas de elevada massa molecular, provando assim a existência das macromoléculas (LAUE; STAFFORD, 1999; CARRUTHERS et al., 2000).

Uma partícula em solução está em constante movimento aleatório que é chamado de movimento Browniano (LAUE; STAFFORD, 1999). A energia cinética associada ao movimento Browniano das partículas está associada a dois tipos de movimentos característicos das moléculas em solução: a difusão translacional e a difusão rotacional que representam o movimento de translação das partículas na solução e a rotação da partícula em torno do seu próprio eixo, respectivamente. A força cinética da partícula em solução encontra uma força de resistência chamada de força friccional (F_f) que depende da sua velocidade e de uma constante relacionada à sua forma e tamanho, denominada de coeficiente friccional (f), sendo que este parâmetro depende da viscosidade da solução (STAFFORD; SCHUSTER, 1995; LEBOWITZ et al., 2002).

Na ausência de uma força externa adicional e se a massa (m) da partícula for desprezível para sedimentar pela ação da gravidade, as duas forças vetoriais, cinéticas e friccional, se anulam resultando num movimento aleatório denominado de difusão. O coeficiente de difusão (D) quantifica a velocidade da partícula no meio, considerando uma área em função do tempo (SCHUCK, 2000; LEBOWITZ et al., 2002).

Segundo Einstein, D está relacionado à temperatura absoluta (T), à constante dos gases (R), ao número de Avogrado (N_{AV}), à constante de Boltzmann (k_b) e é inversamente proporcional ao f , pela seguinte equação (SCHUCK, 2000):

$$D = \frac{RT}{N_{AV}f} = \frac{k_bT}{f}$$

Desta forma, partículas alongadas ou volumosas apresentam maior resistência à sedimentação porque apresentam maior fricção ou atrito na solução e por isso caracterizam-se por um valor de D menor do que as partículas compactas ou esféricas (SCHUCK, 2000; LEBOWITZ et al., 2002). D pode ser facilmente medido experimentalmente a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz, DLS. O coeficiente friccional f de uma partícula está relacionado ao seu raio hidrodinâmico R_H (ou Raio de Stokes) e à viscosidade da solução η por meio da equação de Stokes:

$$R_0 = \left(\frac{3MV_{bar}}{4\pi N_{AV}} \right)^{1/3}$$

No qual, V_{bar} é o volume parcial específico da partícula. Entretanto, na prática, as macromoléculas em solução são solvatadas e dinâmicas (tem movimento) e não são esféricas.

Assim, a massa M determinada usando as técnicas de cromatografia de exclusão por tamanho e o DLS está relacionado ao R_H da partícula, e fornece apenas uma indicação do tamanho “aparente” dessa proteína dinâmica solvatada. Uma proteína monomérica, porém assimétrica, apresentará um R_H superior ao calculado para a mesma proteína globular e pode erroneamente sugerir, em alguns casos, que ela seria um dímero aparente (SCHUCK, 2000; LEBOWITZ et al., 2002; COLE et al., 2008). Conhecendo-se o valor de f experimental de uma partícula, é possível avaliar se ela é uma partícula esférica ou globular através da razão do f pelo f_0 conhecido como razão friccional (f/f_0). O f/f_0 pode ser calculado indiretamente usando o R_H através da equação abaixo (COLE et al., 2008):

$$\frac{f}{f_0} = \frac{6\pi\eta R_H}{6\pi\eta R_0} = \left(\frac{4\pi\eta N_{AV}}{3} \right)^{\frac{1}{3}} R_H (MV_{bar})^{-\frac{1}{3}}$$

Partículas com formatos diferentes ao de uma esfera compacta e lisa (esferoides oblatos, prolatos, etc), considerando a razão do comprimento a versus a altura b , a/b , mas de mesma MM, apresentarão um f/f_0 maior do que 1. Por outro lado, uma proteína globular apresentará o valor de f/f_0 próximo a 1.

Desta forma, a determinação do valor de f/f_0 é uma ferramenta importante para o estudo da simetria e da estrutura de proteínas por técnicas hidrodinâmicas (LAUE; STAFFORD, 1999; SCHUCK, 2000; LEBOWITZ et al., 2002).

Sendo conhecidos alguns dos parâmetros importantes comuns às partículas em solução podemos avaliar as forças que atuam em uma dada partícula de MM, quando exposta a um campo de força centrífuga alto. A força centrípeta, F_c , é uma força que favorece a sedimentação sendo proporcional à velocidade angular (ω). Duas outras forças opostas a esta força atuam no sistema, a força de empuxo F_{Emp} , que depende apenas do volume parcial específico V_{bar} e da densidade da partícula (ρ) e a força friccional F_f que está estritamente relacionada ao formato da partícula (LAUE; STAFFORD, 1999; LAUE, 2001), e depende da velocidade da partícula e do coeficiente friccional.

Quando em um sistema a velocidade angular (ω) é constante, as forças que atuam no sistema se anulam ($F_c + F_{Emp} + F_f = 0$) e a velocidade de sedimentação da partícula pode ser definida pela equação abaixo (RASA et al., 2006):

$$v = \frac{[\omega^2 r \cdot m(1 - V_{bar}\rho)]}{f}$$

Como a massa de uma partícula é ($m = M/N_{AV}$), podemos reorganizar a equação acima em função de v , ω e r a fim de chegarmos a equação de Svedberg, (LEBOWITZ et al., 2002; RASA et al., 2006).

$$\frac{M(1 - V_{bar}\rho)}{N_{AV}f} = \frac{v}{\omega^2 r} = s$$

A equação $v/\omega^2 r = s$ é comumente conhecida como o coeficiente de sedimentação. Portanto, a partir de experimentos de ultracentrifugação analítica podemos obter parâmetros associados às propriedades hidrodinâmicas das partículas, tais como s , D e f . Os fatores complicadores na análise de dados de AUC são a polidispersão de amostras ou a possível presença de mais de uma espécie em solução nas condições estudadas (LEBOWITZ et al., 2002).

A partir das equações, apresentadas até aqui, podemos obter uma equação que relaciona os parâmetros s , D e M , conhecida como a equação de Svedberg-Einstein:

$$M = \frac{sRT}{D(1-v_{bar}\rho)}$$

Como podemos observar na equação anterior, por meio da técnica de ultracentrifugação analítica é possível determinar valores precisos de massa de macromoléculas, pois há uma relação direta entre o valor de s (coeficiente de sedimentação) e a massa molecular da partícula (LEBOWITZ et al., 2002; RASA et al., 2006). Além disso, é possível obter informações importantes sobre a forma e a simetria das proteínas em solução através da razão friccional (f/f_0), coeficiente de difusão (D) e raio de Stokes R_s .

1.6.3 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:

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

Onde A é o valor da absorbância, ϵ corresponde a absorvidade molar, que é característica 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:

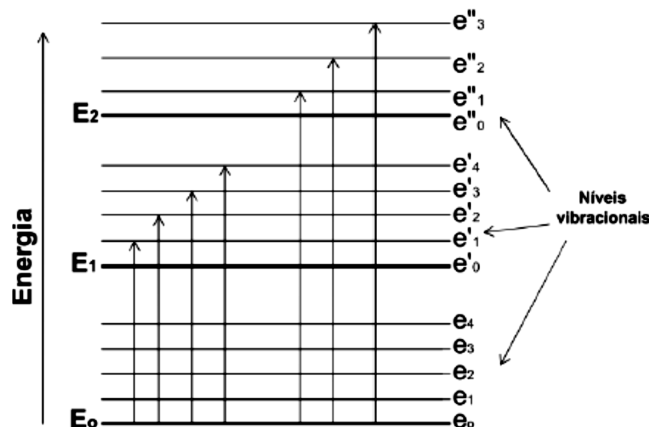


Figura 7 - Ilustração do diagrama dos níveis de energia eletrônicos de uma molécula, sendo E_0 o nível de energia do estado fundamental e E_1 e E_2 níveis de dois estados excitados. As linhas e_0, e_1, \dots, e_4 representam os níveis vibracionais de energia da molécula.

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).

1.6.4 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).

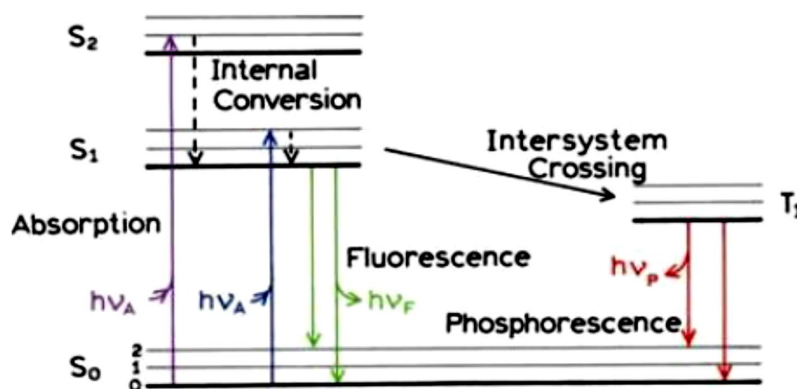


Figura 85 - Diagrama de Jablonski. Absorção de radiação ($S_0 \rightarrow S_1$); Emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$); Conversão interna e relaxação vibracional ($S_2 \rightarrow S_0$); Cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$); Emissão de fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0$).

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 Singleto 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.

A fenilalanina (Phe), a tirosina (Tyr) e o Trp são os principais 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.

1.6.5 LSI

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 espelhamento 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).

As medidas de LSI foram realizadas um espectrofluorímetro RF-6000 SHIMADZU no laboratório de Biomoléculas, no Campus Unesp de Registro -SP.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar características estruturais da hemocianina de camarão, de água doce, *Macrobachium acanthurus* (HcMac) em diferentes condições, no seu estado nativo, como na presença e na ausência de agentes caotrópicos e miméticos de membrana biológica (como por exemplo, surfactantes), diferentes valores de pH e avaliação da atividade biológica. Estes estudos visam avançar na compreensão dos processos de alterações estruturais da HcMac nativa e sua similaridade com outras hemocianinas já estudadas; cujos resultados podem promover possíveis aplicações biotecnológicas para esta hemocianina, até então nunca estudada.

2.2 Objetivos Específicos

1. Extrair a hemolinfa do animal *M. acanthurus* e purificar a HcMac por diálise e ultracentrifugação;
2. Separar e purificar a HcMac e suas subunidades por cromatografia líquida de exclusão de tamanho e eletroforese monodimensional SDS-PAGE;
3. Caracterizar a HcMac por espectrometria de massas MALDI-TOF e por Ultracentrifugação Analítica (AUC);

4. Estudar e analisar o efeito de pH, ureia, SDS na HcMac por técnicas biofísicas como absorção ótica, fluorescência e LSI;
5. Realizar testes de atividade biológica da HcMac em sua forma nativa, após purificação;
6. Avaliar a atividade de fenoloxidase (PO) da HcMac;

3. METODOLOGIA

3.1 Extração

Para extrair a hemolinfa do *Macrobachium acanthurus*, cada animal foi anestesiado em água gelada (5 °C) por um período de 3 a 5 minutos. Em seguida uma seringa (de 1,0 mL de volume) foi preenchida com cerca de 300 µL de anticoagulante citrato de sódio 100 mmol.L⁻¹ e então foi inserida na região do coração do animal. Assim, a hemolinfa foi retirada com o mínimo de contaminação com materiais provenientes do hepatopâncreas e outros. A hemolinfa foi centrifugada a 3.000 x g, à 4 °C por 15 min, para retirada de tecidos e outros contaminantes.

Para eliminar componentes de baixo peso molecular, foi realizada uma diálise com uma membrana de corte de 30 kDa, contra tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ + 20 mmol.L⁻¹ CaCl₂ em pH 7,0 (tampão de armazenamento) por 12 horas, à 4 °C, para posterior etapa de purificação.



Figura 9 - Foto do animal *M. acanthurus* anestesiado para extração de sua hemolinfa (centímetros, a unidade de medida da régua ao lado do animal).

Fonte: Autor (2022).

3.2 Purificação

A hemolinfa de *M. acanthurus* foi ultracentrifugada à 250.000 x *g* durante 5 horas à 4 °C, a HcMac foi obtida através do pellet formado no fundo do tubo, o qual foi resuspenso em tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ + 20 mmol.L⁻¹ CaCl₂ em pH 7,0 e armazenado a 4 °C. A concentração foi determinada utilizando o espectrofotômetro UV-1800 SHIMADZU, com o valor de absorvidade molar $\epsilon_{278 \text{ nm}} = 1,1 \text{ mL.mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (PAOLI et al., 2007).

Na etapa final de purificação, frações de HcMac foram aplicadas em sistema de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), utilizando uma coluna Hiload 16/600 Superdex 200 equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ + CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹, pH 7,0, acoplada no instrumento AKTA Pure L com detector de UV em 280 nm. Todas as frações obtidas foram concentradas utilizando Amicon - Millipore, com membrana de 30 kDa de corte de massa; a concentração final foi de 150 mg.mL⁻¹ em um volume de 4,0 mL, determinada no espectrofotômetro UV-1800 SHIMADZU, utilizando o valor de absorvidade molar $\epsilon_{278 \text{ nm}} = 1,1 \text{ mL.mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (PAOLI et al., 2007), e a proteína foi armazenada à 4 °C para os estudos posteriores.

Com o intuito de dissociar a HcMac e purificar suas subunidades, foram preparadas amostras de HcMac (2,0 mL) na concentração de 10 mg.mL⁻¹, em

tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ e em Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ + CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹, mantidas em equilíbrio durante 18 horas em pH 7,0 e pH 9,2, à 25 °C. Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 3000 x g durante 10 minutos, filtrada em um filtro Millipore de 41 µm e aplicada na coluna de SEC (Hiload 16/600 Superdex 200 PG), com o fluxo de 1,0 mL/min, equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ em pH 9,2 para as amostras preparadas neste tampão e em Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ + CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹ para as amostras preparadas neste tampão.

Todas as frações obtidas foram monitoradas no espectrofotômetro UV-1800 SHIMADZU, com varredura de 700 - 250 nm. A concentração foi determinada utilizando o valor de absorvidade molar $\epsilon_{278 \text{ nm}} = 1,1 \text{ mL.mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (PAOLI et al., 2007) e armazenadas à 4 °C, para serem utilizadas em estudos posteriores. Todas estas análises foram realizadas no Laboratório de Biomoléculas, do Campus de Registro, UNESP.

3.3 Eletroforese monodimensional SDS-PAGE

A massa molecular das subunidades da HcMac foi determinada por SDS-PAGE, aplicada em gel de poliacrilamida 10%, em pH 8,6. As amostras foram preparadas na ausência e na presença de β-mercaptoetanol, na razão 1:1, e aplicadas nos géis com concentração entre 0,03 – 0,1 mg.mL⁻¹. A Eletroforese foi realizada com Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹ e glicina 192 mmol.L⁻¹, pH 6,8, com uma voltagem constante de 140 V. Os géis foram corados e marcados com Coomassie Brilliant R-250 e padrão Precision Plus Protein™ da Bio-Rad.

3.4 Experimentos de espectrometria de massas MALDI-TOF-MS

Para as análises de MALDI-TOF-MS a HcMac purificada foi extensivamente dialisada contra tampão fosfato 5,0 mmol.L⁻¹ para reduzir o excesso de sal das amostras, e em seguida a HcMac foi diluída no mesmo tampão da diálise para uma concentração na faixa de 1,0 – 3,0 mg.mL⁻¹. O ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinâmico (ácido sinápico) foi obtido da Aldrich. O β-mercaptoetanol, o citocromo c (bovino) e a albumina de soro bovino (BSA) foram obtidos da Sigma. O material da matriz de dessorção do laser (ácido sinápico) foi dissolvido em ácido trifluoroacético 0,5 % e acetonitrila/água 50%.

Amostras da HcMac nativa foi diluída na razão de 1:5, 1:10 e 1:20 (v/v) com uma solução saturada de ácido sinápico, matriz (CARVALHO et al., 2011).

Um volume de 1 μL da mistura matriz/amostra foi inserido em cada spot da placa de MALDI e analisado no MALDI-TOF-MS. As análises foram realizadas, aleatoriamente, em modo linear, íon positivo em um Etthan MALDI-TOF espectrofotômetro de massas (Amersham Bioscience) usando uma voltagem de aceleração de 20 kV. Cada spot foi analisado duas vezes, acumulando o espectro composto de aproximadamente 200 disparos de laser no total e o espectro resultante foi analisado pelo software Origin 8.5. O instrumento foi calibrado usando padrões de BSA e citocromo c. As massas moleculares relatadas foram obtidas como médias de vários experimentos individuais e levando em consideração os valores obtidos para espécies moleculares mono-protonadas e di-protonadas.

3.5 Análises de AUC

Os experimentos de AUC foram realizados em uma ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-A, no laboratório Nacional Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP. Foram realizados experimentos de velocidade de sedimentação (SV) da HcMac nas concentrações de 100, 200 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras foram dialisadas por 48 horas contra tampão Tris-HCl 100 mmol.L^{-1} , contendo NaCl 50 mmol.L^{-1} , em pH 7,0. Neste intervalo a solução de dialise foi substituída 3 vezes, sendo a última utilizada como solução de referência para todos os experimentos nas células de AUC.

As diluições de proteína foram realizadas duas horas antes do início dos experimentos utilizando o tampão da última diálise. As medidas de velocidade de sedimentação (SV) foram realizadas na faixa de velocidade de rotação de 15.000 a 40.000 rpm, num rotor tipo (An60Ti rotor), a 20 °C. A aquisição dos dados foi realizada monitorando a absorção em 280 nm (região dos aminoácidos), em intervalos de 7 minutos.

Os dados experimentais de AUC de velocidade de sedimentação (SV) foram analisados usando o programa SEDFIT versão 14.1 (SCHUCK, 2003). As funções de distribuição de coeficientes de sedimentação, $c(S)$ e de distribuição de massas moleculares, $c(M)$, foram ajustadas no software SEDFIT usando os

modelos “Continuous $c(S)$ Distribution model” e “Continuous $c(S)$ Distribution model”, respectivamente (SCHUCK, 2003). Nas análises o valor de V_{bar} foi mantido fixo em $0,755 \text{ mL.g}^{-1}$, enquanto a razão friccional (f/f_0) foi o parâmetro de regularização do ajuste, ou seja, permaneceu livre durante o processo de análise. Os outros parâmetros de entradas como viscosidade (η) e densidade (ρ) do tampão foram obtidos no programa Sednterp (SCHUCK, 2000; 2003). Os valores de s^* obtidos nos ajustes das curvas de $c(s)$ foram corrigidos para condições padrão (Solvente água e $20 \text{ }^\circ\text{C}$), e por regressão linear foi realizada a extrapolação, para condições de concentração infinitamente diluída, ou seja, próximo de 0 mg.mL^{-1} de proteína. Os valores de coeficiente de sedimentação e de massas moleculares foram obtidos no máximo da gaussiana de $c(S)$ e $c(M)$, respectivamente. O grau de confiança nas análises foi fixado em $P = 0,85$ (CARVALHO FAO et al., 2013).

3.6 Análises espectroscópicas

As análises variando o pH entre 3,5 e 10,5 foram realizadas em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , à $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A concentração final da HcMac foi de $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, o pH de cada amostra foi verificado após adição de proteína no tampão. Inicialmente os espectros foram coletados após 1, 3, 6 e 24 horas após o preparo das amostras. Todavia, após 3 horas de equilíbrio os espectros não apresentaram mudanças significativas. Por isso, todos os espectros apresentados nesta análise foram coletados após 3 horas de equilíbrio.

Para os experimentos de titulação da HcMac com ureia foram preparadas amostras distintas em tampão acetato-fosfato 20 mmol.L^{-1} em pH 7,0 e 5,0, com concentrações de ureia entre 0 e $8,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e com uma concentração final de HcMac de $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ para cada amostra. As amostras ficaram em equilíbrio por 2 horas ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) antes de iniciar as medidas espectroscópicas. O tempo de duas horas foi estabelecido devido ao fato de que após este período de equilíbrio os espectros coletados não apresentaram mudanças significativas.

Para as análises de titulação da HcMac com SDS foram preparadas amostras com diferentes concentrações de SDS (0 e 15 mmol.L^{-1}). Todas as amostras foram preparadas em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} em pH 5,0 e 7,0, com uma concentração final de HcMac de $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$. As amostras

ficaram em equilíbrio por 3 horas, à 25 °C, antes das análises espectroscópicas. Todavia, após 3 horas de equilíbrio os espectros não apresentaram mudanças significativas.

Todas medidas espectroscópicas foram realizadas com 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 (Tokyo, Japão) com varredura de 700 – 250 nm.

As medidas de emissão de fluorescência estática e intensidade de espalhamento de luz (LSI do inglês “Light scattering intensity”) foram realizadas em um espectrofluorímetro RF-6000 SHIMADZU (Tokyo, Japão). Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos com excitação em 295 nm, monitorando 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 comprimento de onda de 350 nm.

Todas estas análises espectroscópicas foram realizadas no Laboratório de Biomoléculas, do Campus de Registro, UNESP.

3.7 Ensaios de atividade biológica da HcMac nativa

O Teste de suscetibilidade, o método de micro diluição em caldo, foi realizado de acordo com o descrito no protocolo padrão M27-A3 CLSI (CLSI, 2008) com algumas modificações; este teste foi utilizado com o intuito de determinar a concentração inibitória mínima (MIC). *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida neoformans* (ATCC 90112) foram cultivadas em ágar Sabouraud, durante 24 horas em 28 °C. Cada suspensão fúngica foi preparada em tampão fosfato (PBS) e ajustado para 1×10^6 – 5×10^6 células/mL na câmara de Neubauer, seguido por diluições de 1:50 e 1:20 em meio RPMI 1640 com L-glutamina, 2% de glucose em tampão pH 7,2 com 0,165 M de ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS). A HcMac foi diluída em meio RPMI para obter as concentrações $1,95$ – $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em 96 placas. A suspensão fúngica (100 μL) foi transferida para as microplacas que foram preparadas com as amostras de HcMac (100 μL). O controle de crescimento (100 μL de meio RPMI com 100 μL de inóculo) e o controle negativo (200 μL) foram incluídos. As drogas

Anfotericina B (AMB) e Fluconazol foram utilizadas como controles. As placas foram incubadas a 37 °C, 150 rpm, por 24 horas para *C. albicans* e 48 horas para a *C. neoformans*, protegidas da luz. Após este período, a MIC foi determinada. Os compostos foram testados em triplicata e dois experimentos independentes foram realizados.

O ensaio de viabilidade celular foi avaliado usando o teste de resazurina. As células fúngicas foram semeadas com uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços (KASVI®) e expostas por 24 horas em diferentes concentrações de HcMac ($1,95 - 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi utilizado o DMSO como composto citotóxico (controle positivo) e células com meio completo foram usadas como controle negativo. Após o tratamento, o composto foi removido, as células foram lavadas com tampão PBS (pH 7,4) e foi adicionado 100 μL de solução de resazurina (0,01%). A viabilidade celular foi avaliada calorimetricamente após 4 horas de incubação medindo a redução da resazurina de cor azul para resorufina de cor rosa. A absorbância foi gravada usando um leitor de microplaca (Biotek) em 570 – 600 nm. O teste foi realizado em triplicatas e ao menos três experimentos independentes foram feitos. Estes ensaios, descritos acima, foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara-SP.

Para avaliar atividade antibacteriana da HcMac contra patógenos de peixes, os MICs e MBCs foram determinadas usando o método de microdiluição em caldo recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS) (CLSI, 2014). Em resumo, 20 microlitros de solução de estoque de HcMac $158,64 \text{ mg.mL}^{-1}$ foram transferidos para o 1º poço de uma placa de formato padrão de 96 poços contendo 180 μL de meio e depois foi feita uma diluição em série de 2 vezes (faixa de concentrações: 7932 - 15,49 $\mu\text{g/mL}$). Foram adicionadas bactérias a uma concentração final de 5×10^5 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL a cada poço e incubadas a 28 °C durante 24 h. Os MICs foram determinados em triplicata, com dois poços em cada placa de teste MIC usada como controle de crescimento e esterilidade. Todos os isolados foram recuperados e cultivados com meios específicos para cada cepa antes do uso. O caldo Mueller-Hinton ajustado aos cátions (BD™ Difco™, Lote: 8096574) (CAMHB) foi usado para o teste de susceptibilidade de *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas jandaei*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella*

tarda e *Lactococcus garviae*. CAMHB suplementado com 2,5% (v/v) de sangue de cavalo lisado (LHB) foi usado para o teste de suscetibilidade de *Streptococcus agalactiae*.

Os pontos finais foram determinados usando o método padrão MIC (inspeção visual). A menor concentração de cada antimicrobiano na qual não foi observado crescimento bacteriano na suspensão da cultura foi definida como MIC. Tais suspensões de cultura sem crescimento bacteriano visível foram então espalhadas em placas Mueller Hinton Agar (Sigma - Aldrich®, Lot: BCBS4007V) e incubadas por 24 h em triplicata. A menor concentração na qual nenhum crescimento foi observado visualmente na placa foi considerada como o MBC. *Escherichia coli* ATCC® 25922™ e florfenicol foram utilizados como um controle. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), Jaboticabal-SP.

3.8 Ensaio de atividade fenoloxidase (PO)

As análises de atividade PO da HcMac (0,1 mg.mL⁻¹) foram realizadas à 25 °C. O ensaio incluiu 0,35 mmol.L⁻¹ de cloridrato de dopamina, em tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 7,5. A atividade PO foi induzida com a adição de SDS nas concentrações de 0,01 a 1,0 mmol.L⁻¹ e monitoradas através da formação de dopacromo e derivados (absorção em 475 nm), com intervalos de 1 e 5 minutos após a adição de surfactante. Todas estas análises foram realizadas no Laboratório de Biomoléculas, do Campus de Registro, UNESP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação

Após o processo de ultracentrifugação foram separadas três frações de cada tubo, sendo a parte mais clara do sobrenadante do tubo denominada de Fração A (F_A), o conteúdo amarelado entre o sobrenadante e o sedimentado azul de Fração B (F_B), que refere-se à lipoproteína da hemolinfa (YEPIZ-PLASCENCIA et al., 1995; FIGUEROA-SOTO et al., 1997), e a parte azul sedimentada de Fração C (F_C), como é mostrado na Figura 10.

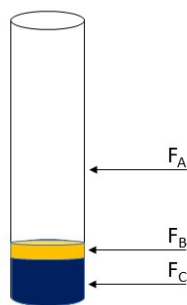


Figura 10 - Ilustração do tubo com amostra após o processo de fracionamento por ultracentrifugação.

Fonte: Autor (2022).

A coloração azul da hemolinfa é devida a transferência de carga ligante-metal ($O_2^{2-} \rightarrow Cu^{2+}$), no estado oxigenado da HcMac, resultante da mudança de estado do Cu(I) para Cu(II) no centro metálico. A forma oxi-Hc é caracterizada por um espectro de absorção com uma banda intensa e larga em 340 nm e ϵ (coeficiente de absorvidade molar) de $20.000 M^{-1} cm^{-1}$ (COATES; NAIRN, 2014). Portanto, a coloração azul intensa na fração F_C sugere altas concentrações da forma oxi-HcMac nesta fração, sendo a mesma selecionada para as etapas posteriores de purificação.

A HcMac obtida após o processo de ultracentrifugação (F_C) foi aplicada em uma coluna de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), em tampão Tris-HCl $100 mmol.L^{-1}$ + $CaCl_2$ $20 mmol.L^{-1}$, pH 7,0 e as frações monitoradas em comprimento de onda de 280 nm, foram separadas e coletadas (Figura 11).

O cromatograma da HcMac apresenta dois picos (Figura 11), sendo o Pico b, a espécie predominante em solução. Ambos os picos foram avaliados por absorção ótica UV-vis e SDS-PAGE (dados não mostrados), porém somente o Pico b apresentou espectro e padrão de massas moleculares característico de Hcs, demonstrando que a proteína não estava totalmente purificada após a ultracentrifugação. Assim, o Pico b foi considerado como oxi-HcMac e utilizado nos estudos posteriores. A SEC é um método muito utilizado na purificação de proteínas e tem demonstrado ser uma boa opção para isolar e purificar Hcs, e proteínas de alto peso molecular (FIGUEROA-SOTO et al., 1997; PAOLI et al., 2007; ZHANG et al., 2009; MULLAIVANAN SAMASAMY et al., 2017).

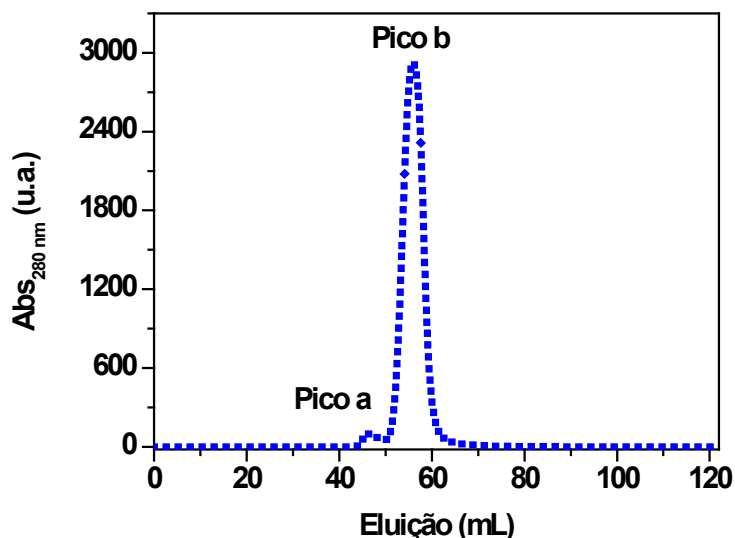


Figura 11 - Perfil de eluição da hemoproteína HcMac ($50,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em cromatografia líquida de exclusão por tamanho, após fracionamento por ultracentrifugação, em uma coluna Hiload 16/600 Superdex 200 PG, equilibrada com tampão Tris-HCl $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ + CaCl_2 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH 7,0, a 25°C . Com fluxo de $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Fonte: Autor (2022).

Há diversos estudos que envolvem a extração e purificação de biomoléculas com o intuito de compreender suas propriedades biofísicas e estruturais (COATES; NAIRN, 2014). Neste contexto, foi relatado que a estabilidade conformacional dos agregados nativos de várias Hcs de artrópodes e suas subunidades estruturais isoladas indicam que forças hidrofílicas e polares estabilizam a estrutura quaternária (DOLASHKA-ANGELOVA et al., 2000). O comportamento de reassociação da Hc do caranguejo *Carcinus maenas* foi analisado por ESI-MS e não foi observada uma completa reassociação da Hc ao retornar a um pH neutro após a dissociação (BRUNEAUX et al., 2009).

A seguir, são apresentados os dados de SEC da HcMac ($10,0 \text{ mg}$), em tampão Tris-HCl $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH 7,0 e pH 9,2, mantida 18 horas na ausência de cálcio à 25°C (Figura 12A). O Pico b, em ambos pHs, apresenta o mesmo volume de eluição de 55 mL , referente a HcMac íntegra (obtida no Pico b da Figura 11). Enquanto que em pH 9,2 aparece o Pico c, com um volume de eluição de 70 mL , indicando a presença Hc em diferentes estados de agregação em consequência do processo de dissociação induzido pelo pH alcalino.

Na Figura 12B é mostrado o perfil de eluição da HcMac que foi mantida em pH 9,2 na presença de cálcio por 18 horas, à 25°C . O resultado sugere que, nestas condições, a HcMac apresenta 3 estados de agregação e apresenta dois

picos com maiores intensidades, por volta de 45 mL e 70 mL (Pico d e c). Contudo, o cálcio não impediu a dissociação da proteína, que demonstrou ser dependente do pH, mas favoreceu a formação de diferentes estados de agregação. Este comportamento é uma característica típica das Hcs que sofrem alterações no estado de agregação em função da variação nos valores de pH e na presença dos cátions di-valentes, como Ca^{+2} e Mg^{+2} (PAOLI et al., 2007; TAYLOR et al., 2000; GREAVES et al., 1992).

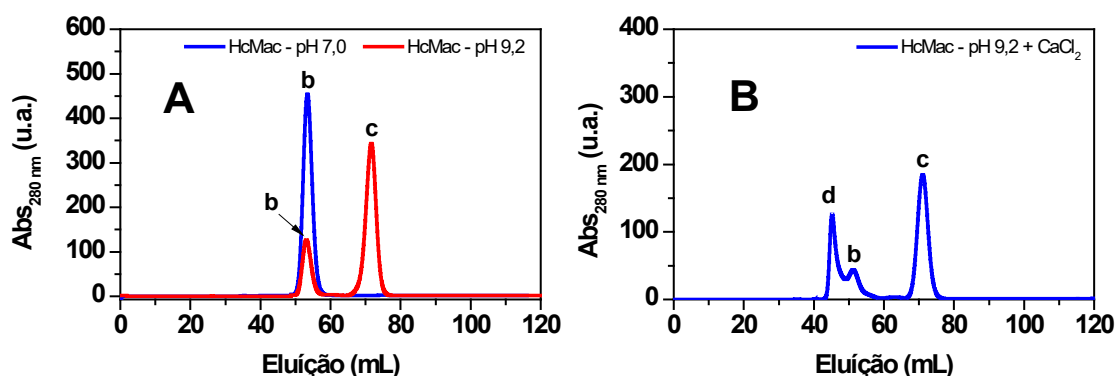


Figura 12 - (A) Perfil de eluição HcMac ($10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) em uma coluna Hiloal 16/600 Superdex 200 PG, equilibrada com tampão Tris HCl 100 mmol.L^{-1} em pH 7,0 (linha azul) e pH 9,2 (linha vermelha), à 25°C . (B) Eluição da HcMac ($10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) por SEC em coluna equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mmol.L^{-1} + CaCl_2 20 mmol.L^{-1} , em pH 9,2, a 25°C .

Fonte: Autor (2022).

Paoli e colaboradores (2007) avaliaram o estado de agregação da Hc de *Upogebia pusilla* e constataram que em tampão pH 7,6, na presença de 20 mmol.L^{-1} de CaCl_2 , a proteína apresenta uma estrutura de $4 \times$ hexâmero (4×6). E com a remoção do cálcio ocorre uma dissociação para o estado de agregação $2 \times$ hexâmero (2×6).

Segundo Siezen e Van Driel (1974), os íons de cálcio são extremamente eficazes para evitar a dissociação com baixa força iônica. Esta capacidade de estabilização diminui à medida que a força iônica é elevada, possivelmente porque a afinidade da proteína para os íons de cálcio diminui com a força iônica mais elevada e a dependência do pH da dissociação é frequentemente menos acentuada na presença de íons de cálcio.

Estes resultados, embora não conclusivos, sugerem que a HcMac sofre uma dissociação, reduzindo o tamanho do oligômero. Deste modo, o estado de agregação da HcMac, assim como de outras Hcs, mostrou ser governado pelo

pH e pela presença de cátion divalente (Ca^{+2}), como em estudos com as Hcs de *Callinassa californiensis* e *Upogebia pusilla* (MILLER; VAN HOLD, 1974; PAOLI et al., 2007).

4.2 Eletroforese monodimensional SDS-PAGE

Os resultados das análises de SDS-PAGE mostram que o agente redutor β -mercaptoetanol não alterou o padrão de massas da HcMac, como mostrado na Figura 13A e 13B. Em ambos os géis a HcMac apresentou duas bandas de massas moleculares próximas de 75 e 76 kDa, o que corrobora com estudos reportados para outras Hcs de crustáceos. Os camarões *Caridina multidentata* e *Atyopsis moluccensis* apresentam subunidades entre 77 e 87 kDa (MARXEN et al., 2013), as lagostas *Astacus astacus* e *Cherax destructor* apresentaram diferentes subunidades entre 71 e 98 kDa (JAENICKE; DECKER, 2003; ROGALA; GONDKO, 1981).

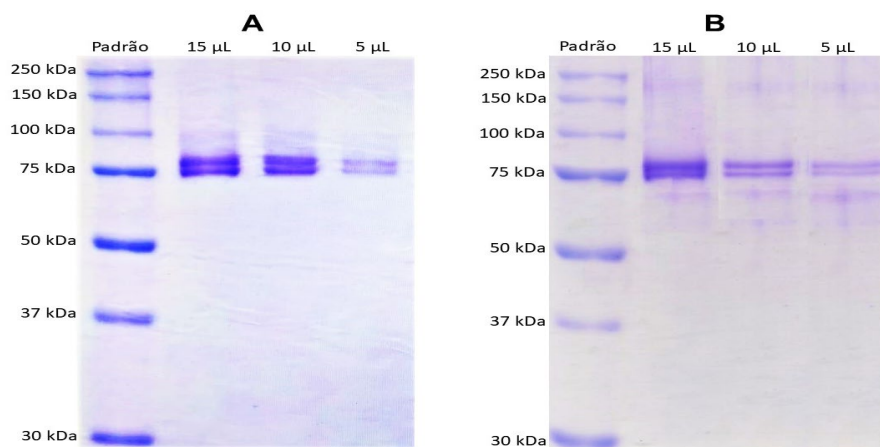


Figura 6 - Gel de eletroforese em poliacrilamida - 10% (SDS-PAGE), do Pico II (HcMac) da fração F_C da hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* após cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). (A) na ausência de agente redutor β -mercaptoetanol; (B) na presença de agente redutor β -mercaptoetanol.

Fonte: Autor (2022).

Mallaivanam Ramasamy e colaboradores (2017), estudando a Hc do camarão *Macrobrachium rosenbergii*, obtiveram bandas de 50, 60, 114 e 325 kDa em gel de poliacrilamida (7%) na ausência de redutor. No entanto, a desnaturação das proteínas em SDS revelou que as bandas 50 e 60 kDa são monômeros, a banda de 114 kDa é um dímero com subunidades monoméricas

de 56 e 58 kDa, e a banda de 325 kDa é um trimero composto por subunidades monoméricas de 74, 76 e 78 kDa.

Como foi observado não há mudança significativa nos géis, sugerindo o indício de bandas próximas de 75 kDa são referentes as espécies monoméricas da HcMac, não sendo possível observar nestas condições desnaturantes, dímeros ou outros oligômeros de subunidades. Dolashki et al. (2019) constatou por microscopia eletrônica que a Hc do molusco *Cornu aspersum* (CaH) se dissocia em pH 9,6, prevalecendo subunidades monoméricas isoladas e/ou compactas de CaH, e que tais subunidades não se dissociam mais sob estas condições. Embora, a estabilidade das Hcs depende da agregação das subunidades heterogêneas em variadas formas de oligômero para exercer múltiplas funções biológicas (LEE et al., 2004; WRIGHT et al., 2012).

4.3 Análises dos espectros de MALDI-TOF-MS

A Figura 14A mostra o espectro de massas da HcMac no pH 7,0, usando o ácido cinápico como matriz no modo de íon positivo. Os picos representam a ionização das subunidades da HcMac, os quais apresentaram maior intensidade nas faixas entre 35 - 40 kDa e entre 70 - 80 kDa.

Os resultados mostram que a HcMac apresentou subunidades monoméricas mono-protonadas ($HcMac_{1^{+1}}$ e $HcMac_{2^{+1}}$) com massas moleculares por volta de 75 e 76 kDa (Figura 14B), duas cadeias monoméricas di-protonadas em torno de 37 e 45 kDa e duas subunidades monoméricas tri-protonadas próximas de 25 kDa (Figura 14C).

Os dados sugerem que estas duas subunidades monoméricas de 75 e 76 kDa são referentes as duas bandas próximas de 75 kDa nos géis de poliacrilamida (10%), apresentados anteriormente na Figura 13A e 13B. Assim, os resultados indicam que a HcMac é composta por monômeros de 75 e 76 kDa, de modo similar à outras Hcs de camarões.

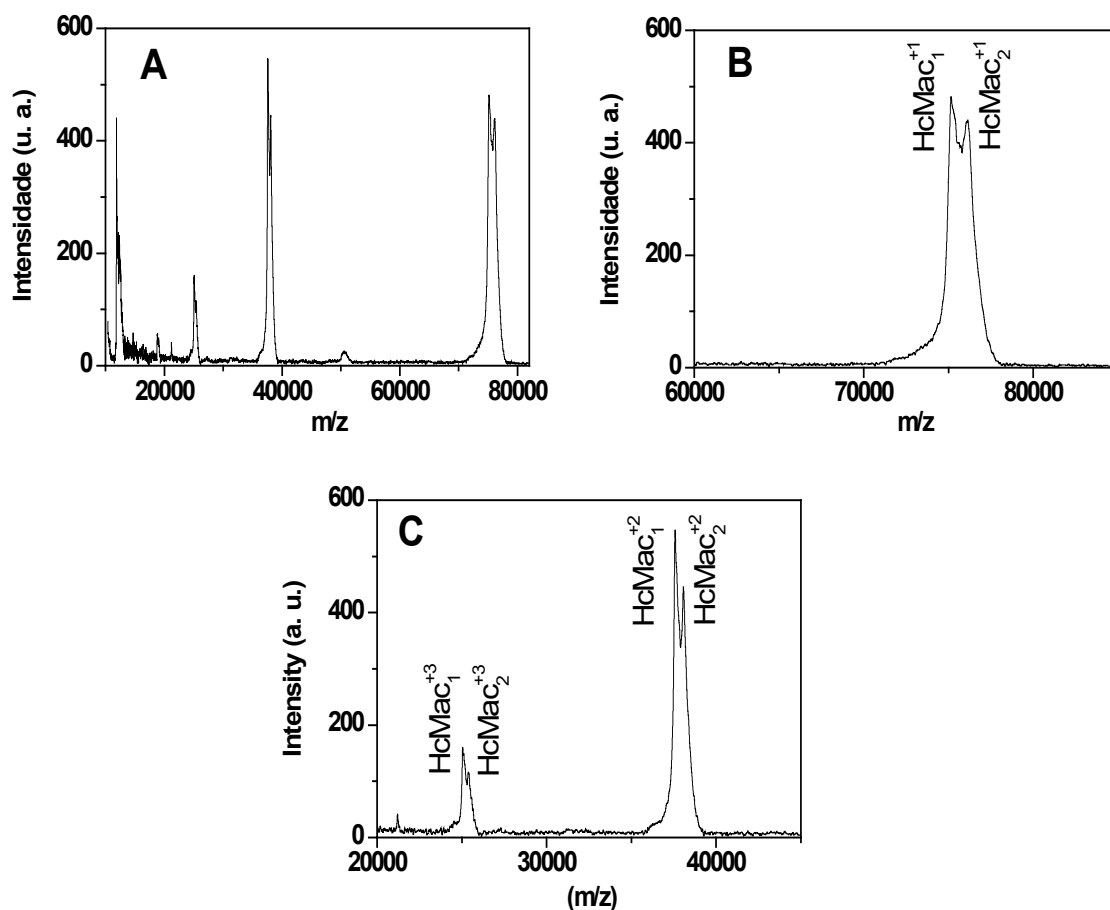


Figura 7 - (A) Espectro de MALDI-TOF-MS da hemocianina de *Macrobrachium acanthurus* (HcMac), pH 7.0; (B) Região de massa expandida de 60,000 a 90,000 Da, para as cadeias monoméricas mono-protonadas; (C) Região massa expandida de 20,000 à 50,000 Da, para as cadeias monoméricas di e tri-protonados.

Fonte: Autor (2022).

4.4 Análises dos dados de AUC

As curvas de distribuição, $c(s)$, dos coeficientes de sedimentação para três concentrações de HcMac no pH 7,0 apresentam um único pico, indicando uma alta homogeneidade do sistema (Figura 15A). O valor de coeficiente de sedimentação extrapolado para zero de concentração de proteína, 20 °C e em solvente aquoso, $s_{20,w}^0$ para a HcMac é de 19S. Este valor está próximo da forma de um hexâmero (1×6), cujo valor de coeficiente de sedimentação reportado na literatura para esta espécie é 17S (MILLER et al., 1977; TAYLOR et al., 2000).

A literatura reporta o s de Hcs de crustáceos com 39S para forma de agregação 4×hexâmero (4×6), apresentando estados de agregação em

transição de 25S e 29S (ARISAKA; VAN HOLDE, 1979; TAYLOR et al., 2000; PAOLI et al., 2007). No entanto, no presente sistema não foram observadas espécies com valores de sedimentação inferior ou superior a 19S, o que indica uma alta homogeneidade em solução de uma única espécie de Hc.

Na Figura 15B, as curvas distribuições de c (M) são mostradas para as três concentrações de hemocianina. A partir dos valores de $S_{20,w}$ foi calculada a massa molecular da HcMac pela razão s/D , onde obteve-se 450 kDa. Este conjunto de dados, apresentados até aqui, indicam que a estrutura oligomérica da HcMac é constituída por cadeias monoméricas, com MM de 75 e 76 kDa, que se agregam para formar 1×hexâmero de 450 kDa.

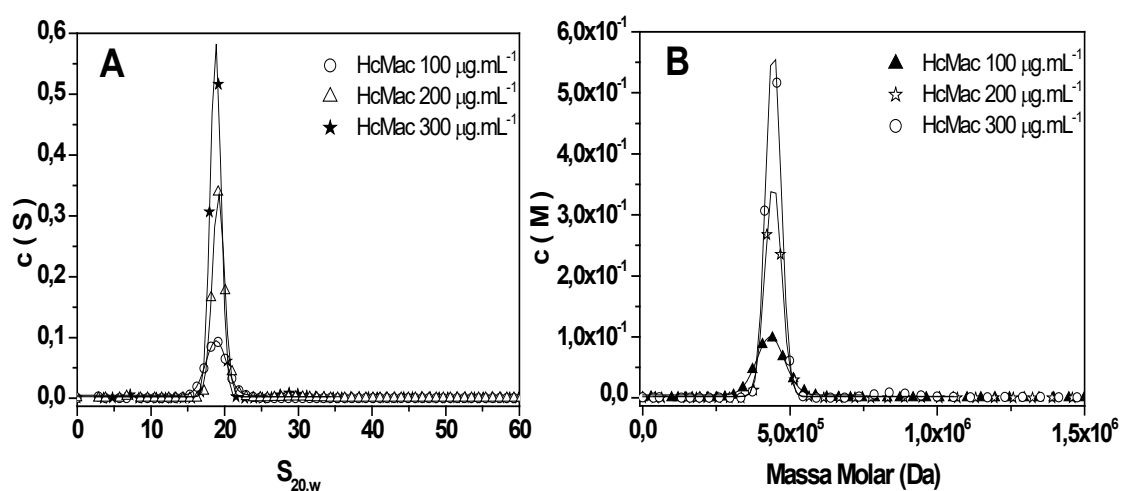


Figura 8 - (A) Coeficiente de sedimentação obtido para a HcMac em pH 7,0. (B) Distribuição contínua da massa molecular da HcMac em diferentes concentrações em solução.

Fonte: Autor (2022).

De acordo com a literatura as Hcs de crustáceos são constituídas por 6 subunidades monoméricas estruturais e funcionais (com MM em torno de 75 kDa), que possuem um centro de Cu di-nuclear que se liga reversivelmente ao O_2 . São encontradas como oligômeros na forma hexâmeros complexos (TAYLOR et al., 2000; PAOLI et al., 2007).

Coates e Nairn (2013) relataram que a Hc da lagosta-da-noruega (*Nephrops norvegicus*) apresenta subunidades monoméricas com MM próximas de 72 e 74 kDa em géis de SDS-PAGE. Através de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS), a Hc nativa purificada do crustáceo, apresentou um raio

de giro de $8,3 \pm 2$ nm, sugerindo que a Hc estava presente na forma de um hexâmero.

4.5 Análises espectroscópicas da HcMac nativa em função do pH

Estudos que envolvam a natureza do solvente, pH e força iônica são cruciais para uma melhor compreensão sobre os principais fatores que podem afetar a integridade das hemoproteínas. O valor do pH caracteriza o equilíbrio entre íons H^+ e OH^- de uma determinada solução e sua alteração afeta o equilíbrio de ionização de grupos ácidos e alcalinos de uma proteína. Assim, mudanças no valor de pH podem afetar a distribuição de cargas de uma proteína e, conseqüentemente, as interações eletrostáticas entre as subunidades da proteína, entre a proteína e o solvente e entre as próprias moléculas do solvente. Estas alterações podem ser vistas a partir de mudanças conformacionais da estrutura proteica, permitindo avaliar o efeito da variação do pH na estabilidade oligomérica, no enovelamento e função da proteína (SANTIAGO et al., 2010; OTZEN, 2011).

O espectro de absorção ótica da HcMac é caracterizado por uma banda de absorção em 280 nm, referente aos aminoácidos aromáticos, e uma banda em 340 nm, referente ao centro di-cobre (Figura 16A), o que está de acordo com o espectro de absorção característico de outras oxi-hemocianinas (BAIRD et al., 2007; COATES; NAIRN, 2014).

A variação no pH alterou a afinidade da HcMac ao oxigênio, o que resultou em um aumento na intensidade do espectro de absorção da banda em 340 nm (Figura 16B) quando o valor do pH é acidificado ou alcalinizado. Na Figura 16C observa-se que na região de pH ácido (4,0 a 4,9) tem-se uma maior intensidade de absorbância em 340 nm, como um máximo de intensidade de absorção no valor de pH 4,4. Na região de pH 5,2 a 7,3 observa-se que a banda em 340 nm desaparece, apresentando uma intensidade de absorção em torno de 0,05. Já para valores de pH acima de 8,0 a banda em 340 nm é eminente, com intensidade próxima aos valores observado em pH ácido. Ou seja, na faixa de pH ácido (4,0 a 4,9) e de valores de pH acima de 8,0 a banda em 340 nm é eminente sugerindo que nestas faixas de pH a proteína apresenta maior afinidade por O_2 .

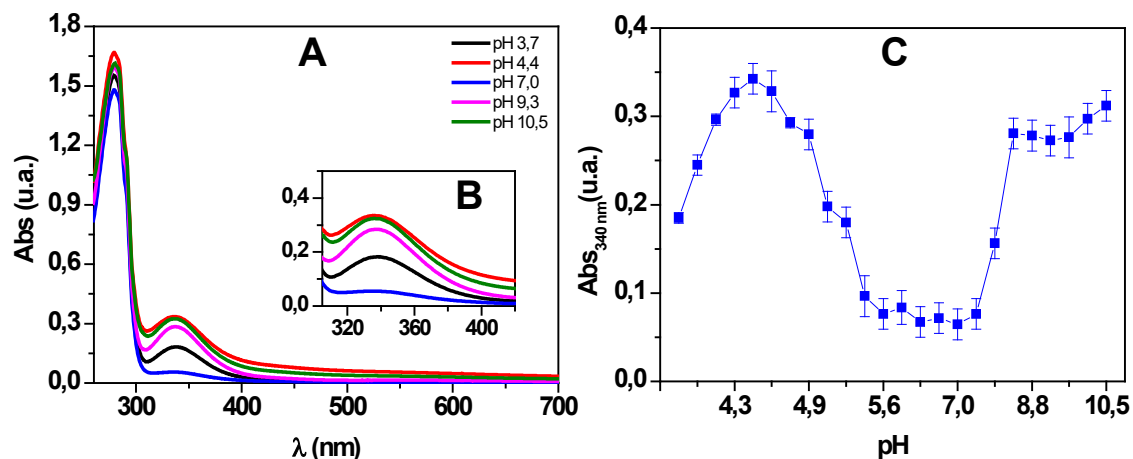


Figura 9 - (A) Espectros de absorção óptica da HcMac (1,6 mg.mL⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 30 mmol.L⁻¹, na faixa de pH entre 3,7 – 10,5. (B) Inseto da Figura 17A. (C) Região de absorção em 340 nm dos espectros da Figura 16A. As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 5 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

Assim, estes resultados sugerem que a HcMac apresenta maior afinidade por oxigênio em valores de próximos de pH 4,4 e acima pH 8,0, à 25 °C. Este comportamento pode estar relacionado ao desdobraimento da proteína em pH alcalino e início do processo de desnaturação ácida em valores de pH abaixo de 4,4, semelhante a oxi-Hc multimérica de moluscos que apresentam um pequeno intervalo de reversibilidade de desnaturação ácida, em valores acima de pH 5,0, apresentando afinidade em se ligar ao O₂ (DOLASHKI et al., 2019).

Taylor e colaboradores (2000), em um estudo comparativo envolvendo a Hc de 5 espécies de camarões de lama observaram que as Hcs apresentaram maiores afinidades pelo oxigênio na faixa de pH entre 7,68 - 7,83, à 10 °C. Enquanto que as maiores afinidades pelo oxigênio ocorreram em pH 8,2 para a Hc do camarão fantasma *Callinassa californiensis* (MILLER; VAN HOLD, 1981) e pH 8,0 para a Hc do caranguejo *Bythograea therymydron* (SANDERS; CHILDRES, 1992), ambos à 15 °C.

Os resultados de emissão de fluorescência, após excitação em 295 nm para monitorar o Triptofano (Trp), mostram que a forma oxi-HcMac em pH 7,0 apresenta um máximo de fluorescência em 327 ± 1 nm. Este máximo de fluorescência pode sugerir que o resíduo de Trp está presente em meio apolar (VOET et al., 2014). Além disso, estes resultados mostram que ocorre uma

redução na intensidade de fluorescência para valores de pH ácidos e alcalinos, em relação ao valor de pH 7,0 (Figura 17A).

Os dados apresentados na Figura 17B, referente a área total de emissão de fluorescência, sugerem que a HcMac apresenta maior estabilidade em valores de pH entre 5,9 e 7,8, pois em valor de pH inferior a 5,9, inicia uma redução de emissão de fluorescência até o pH 4,4 e o aumento do valor de pH (acima de 7,8) reduz drasticamente a fluorescência, atingindo um platô em pH 8,3. Estes resultados estão de acordo com as análises dos espectros UV-vis apresentados anteriormente (Figura 16C).

Os resultados de emissão de fluorescência sugerem que se inicia o processo de desnaturação de HcMac em valores inferiores ao pH 4,4, pois induz a um deslocamento do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) de emissão de fluorescência para valores maiores (Figura 17C), que corrobora com os dados das análises UV-vis que demonstram uma redução da afinidade pelo O₂ em valores de pH abaixo de 4,4 (Figura 16C).

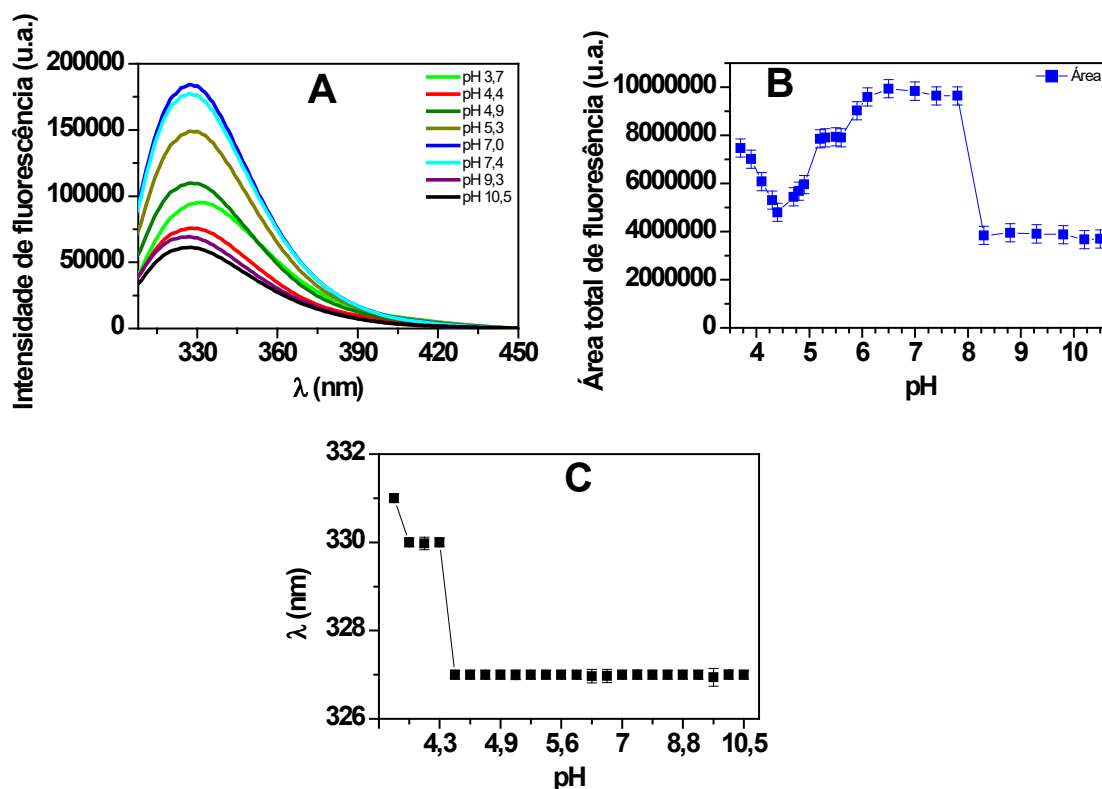


Figura 10 – (A) Espectros de emissão de fluorescência da HcMac ($1,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), em tampão acetato-fosfato-borato $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. (B) Área total de emissão de fluorescência dos espectros apresentados na Figura 17A. (C) Comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência dos espectros da Figura 17A. As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 5 medições diferentes, todas realizadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fonte: Autor (2022).

Varshney et al. (2010), monitoraram alterações no microambiente dos resíduos de Trp da Hc do molusco *Megathura crenulata* ou lapa de fechadura (*Keyhole limped* – KLH) através das mudanças na intensidade e $\lambda_{\text{máx}}$ da fluorescência do Trp em função do pH. Na faixa entre o pH 7,4 – 4,0 não houve alterações na intensidade de fluorescência em 340 nm e $\lambda_{\text{máx}}$, entretanto quando reduziu o pH abaixo de 4,0 até 2,8, a intensidade de fluorescência aumentou de forma intensa e ocorreu um deslocamento no $\lambda_{\text{máx}}$ para valores maiores, de 332 para 344 nm. Este comportamento no deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ é um indício de que o microambiente do resíduo de Trp estava ficando mais polar e o aumento na intensidade de fluorescência ao longo do desdobraimento da KLH em meio ácido ocorreu devido à redução na supressão de alguns resíduos de Trp.

Em outro estudo envolvendo a Hc do crustáceo *Eriocheir japonica sinensis* na presença do desnaturante cloridrato de guanidina (GuHCl), Tang e

colaboradores (2009) relatam que a estrutura **Cu=O₂-Cu...Trp** é destruída causando um aumento na intensidade de fluorescência e relacionam este comportamento a uma mudança desta conformação estrutural, que deixa o Trp mais distante do Cu e assim prejudicando a transferência de energia.

Velkova et al. (2010) purificaram e analisaram a Hc nativa do caracol de jardim *Helix lucorum* (HIH) e suas subunidades funcionais (FU) por espectroscopia de fluorescência, excitando o Trp das cadeias laterais em 295 nm. A fluorescência da HIH teve um $\lambda_{\text{máx}}$ de 335 ± 1 nm, que é típico para Trp profundamente enterrados em ambiente hidrofóbico, enquanto para a FU o $\lambda_{\text{máx}}$ foi deslocado para 342 ± 1 nm, em consequência da exposição das cadeias laterais de Trp na superfície da molécula.

Em geral, em hemoproteínas, o aumento da intensidade de fluorescência é consistente com a redução da transferência de energia dos Trp para o grupo heme, onde o aumento da exposição dos fluoróforos ao solvente aquoso pode estar associado ao processo de dissociação da proteína (BAIRD et al., 2007).

Assim, a diminuição da intensidade de fluorescência, de maneira mais acentuada acima de pH 7,4, pode estar relacionada com a dissociação da HcMac, pois ao mesmo tempo que a dissociação expõe os resíduos de Trp ao solvente, o mesmo pode sofrer supressão de fluorescência devido a sua aproximação ao metal pesado do centro di-cobre. Vale salientar que as Hcs contêm em média cerca de 5 a 8 resíduos de Trp por subunidade (BAIRD et al., 2007).

Dolashki et al. (2019) constataram por microscopia eletrônica que a Hc do molusco *Cornu aspersum* (CaH) se dissocia em pH 9,6 e os dados mostram que o tampão alcalino induz um forte ambiente de dissociação, assim prevalecendo subunidades monoméricas isoladas e/ou compactas de CaH, e que estas subunidades não se dissociam mais sob estas condições.

Os resultados das medidas de LSI, apresentados na Figura 18, mostram que a LSI da HcMac tende a se manter constante entre os valores de pH 5,3 – 8,4 e apresenta dois platôs com maior intensidade, o primeiro aparece na faixa entre os valores de pH 4,2 e 5,3 e o segundo entre os valores de pH 9,3 e 10,5. O primeiro platô pode estar relacionado com o *pI* da HcMac na região de pH ácido (4,2 - 5,3), assim como outras Hcs de crustáceos que apresentam *pI* ácido.

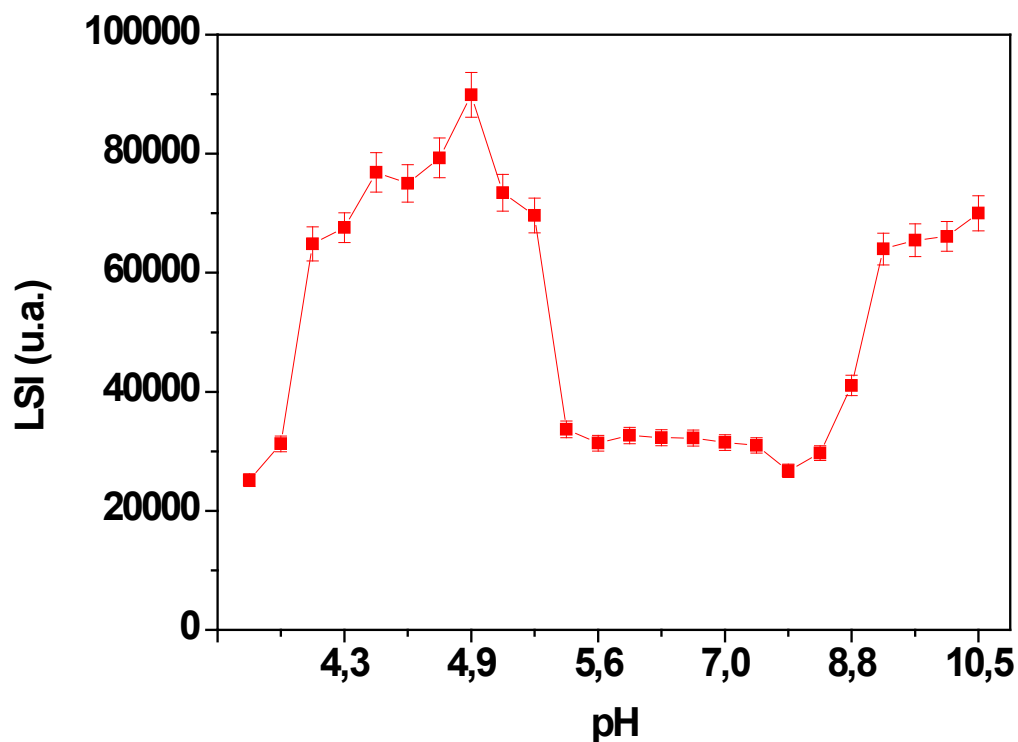


Figura 11 - Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HcMac ($1,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão acetato-fosfato-borato $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, em diferentes valores de pH. As barras de erro representam o desvio padrão ($\pm \text{SD}$) de 5 medições diferentes, todas realizadas à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fonte: Autor (2022).

Outros estudos com crustáceos reportam que a Hc do camarão branco *Penaeus vannamei* apresenta duas bandas no gel de eletroforese bidimensional com *pI* muito próximos de 4,8 e 4,9 (FIGUEROA-SOTO et al., 1997). Enquanto o camarão *Penaeus indicus* apresenta dois valores de *pI*, 4,2 e 4,25 (NOEL; MARTIN, 1995). A Hc da lagosta *Palunirus japonicus* apresentou quatro subunidades com diferentes valores de *pI*, sendo de 79 kDa com *pI* = 5,38, 84 kDa com *pI* = 5,06, 88 kDa com *pI* = 5,11 e 90 kDa com *pI* = 5,1 (MAKINO; KIMURA, 1988).

Já o aumento da LSI na região de 9,3 – 10,5 (segundo platô) pode ser associado à agregação/desnaturação da HcMac, corroborando com a redução na intensidade de emissão de fluorescência (Figura 17B) e o aumento na absorção em 340 nm (Figura 16C), pela maior exposição do centro di-cobre e presença de O_2 .

O conjunto de dados das análises espectroscópicas apresentadas indicam que a HcMac apresenta uma faixa de maior estabilidade nos valores de

pH entre 5,5 - 7,4, as medidas de UV-vis mostram que nesta escala ocorre a menor afinidade por O₂ no centro di-cobre (mostrado na Figura 16C), menores variações na intensidade de emissão de fluorescência e sem mudanças no $\lambda_{\text{máx}}$ emissão (mostrado nas Figuras 17B e C), e desprezíveis perturbações no tamanho do oligômero de acordo com os dados de LSI (Figura 18).

Estes resultados são similares aos de Varshney e colaboradores (2010), que através de análises de dicroísmo circular (CD), constataram que a molécula de KLH não sofre alterações significativas na elipticidade em 222 nm entre pH 5,0 e 8,0 (com um pequeno intervalo de reversibilidade parcial em meio ácido). Em valores abaixo de pH 5,0 ocorreu uma drástica redução, com menor valor em pH 2,8. Por isso, estudos por CD da HcMac em função do pH devem ser avaliados para avançarmos na compreensão da estabilidade da estrutura secundária em diferentes valores de pH.

4.6 Análises da HcMac em função da concentração de ureia nos valores de pH 5,0 e 7,0

O espectro de absorção óptica da HcMac (1,6 mg.mL⁻¹) pura em solução tampão é caracterizado por uma banda em 280 nm e outra banda em 340 nm. Em pH 5,0 quando comparado ao pH 7,0, observa-se um aumento da intensidade de absorção em 340 nm (Figura 19). Este aumento da intensidade de absorção pode estar associado a processos de oxidação em valores de pH ácidos. Dolashki e colaboradores (2008) estudaram a Hc de *Rapana venosa* (RvH) em seu estado nativo por dicroísmo circular, a RvH apresentou uma maior estabilidade na faixa de pH 5,0 – 8,0 à 20 °C. Com base nestas informações os experimentos foram realizados nos valores de pH 5,0 e 7,0.

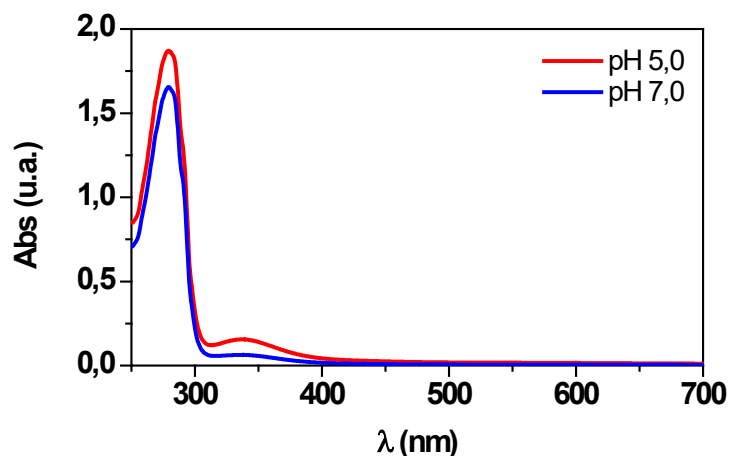


Figura 19 - Espectro de absorção óptica da HcMac $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , em pH 5,0 e 7,0 equilibrada por 3 horas.

Fonte: Autor (2022).

Observou-se em pH 5,0 (Figura 20A) um aumento da intensidade de absorção em 340 nm, para a faixa de concentração de ureia entre $0,5 - 2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, que corresponde banda do centro di-cobre (Figura 20B), sugerindo que ocorre uma maior exposição do centro metálico para a ligação ao oxigênio devido a presença do desnaturante na solução. A intensidade de absorção em 340 nm, na concentração de $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ aumenta em fator de 3,2 quando comparada com 0 mol.L^{-1} de ureia (Figura 20C). Em concentrações superiores a $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de ureia, a intensidade de absorção em 340 nm diminui de forma acentuada até $4,5 \text{ mol.L}^{-1}$, com valor de absorção menor ao da proteína pura em solução, e permanece constante em concentrações superiores.

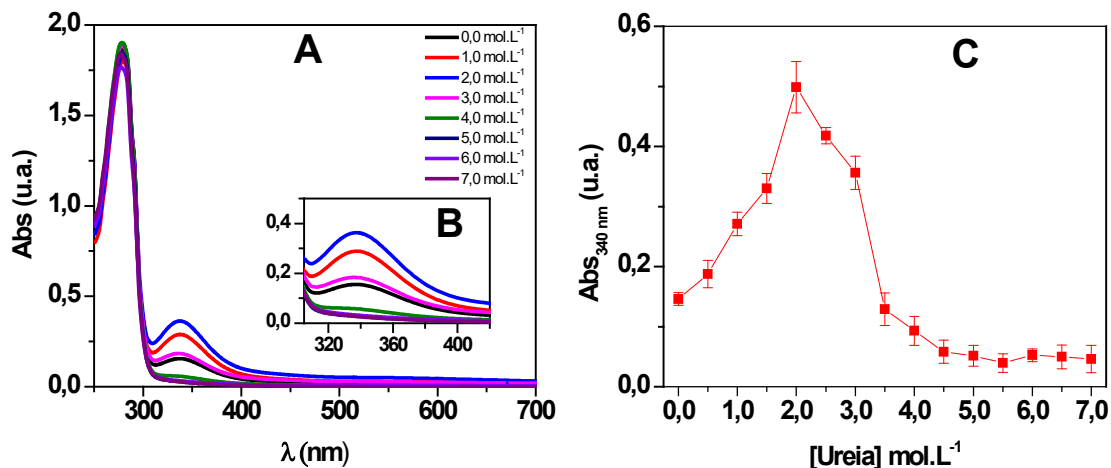


Figura 12 - (A) Espectro de absorção ótica da HcMac 1,6 mg.mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato 20 mmol.L⁻¹ pH 5,0, em função da concentração de ureia. (B) Inseto da Figura 20A, região da banda do centro di-cobre. (C) Inseto da Figura 20A, absorção em 340 nm. As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 5 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

Na Figura 21A são apresentados os espectros de absorção ótica da HcMac (1,6 mg.mL⁻¹) no pH 7,0 em função da concentração de ureia, após 2 horas de equilíbrio. Os resultados mostram que o desnaturante provocou alterações na afinidade do centro di-cobre da hemoproteína pelo O₂; os espectros apresentam oscilações em 340 nm (Figura 21B). Através das análises destes resultados observa-se na Figura 21C, de modo mais claro, um aumento da intensidade de absorção da banda em 340 nm com a adição de ureia entre 0,5 - 4,0 mol.L⁻¹, atingindo uma maior intensidade entre 3,0 - 4,0 mol.L⁻¹ de ureia.

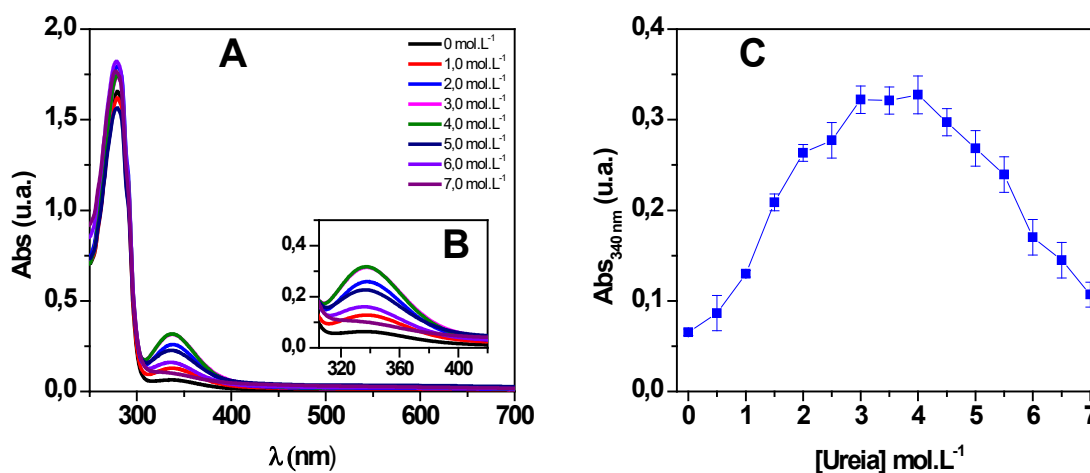


Figura 13 - (A) Espectro de absorção ótica da HcMac 1,6 mg.mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato 20 mmol.L⁻¹ pH 7,0, em função da concentração de ureia. (B) Inseto da Figura 21A, região da banda do centro di-cobre. (C) Inseto da Figura 21A, absorção em 340 nm. As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 5 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

As adições de concentrações de ureia inferiores a 4,0 M sugerem que ocorre uma maior exposição do centro di-cobre, provavelmente devido a ação desnaturante da ureia na estrutura da HcMac, ocasionando o desenovelamento e deixando o sítio ativo da HcMac mais exposto ao solvente, assim facilitando a exposição das partes centrais hidrofóbicas da hemocianina (BENNION; DAGGETT, 2003).

A redução da banda de absorção do centro di-cobre (340 nm) acima das concentrações de 2,0 mol.L⁻¹ (pH 5,0) e 4,0 mol.L⁻¹ (pH 7,0), sugerem que inicia-se a dissociação da HcMac. Segundo Siezen e Van Driel (1974) a dissociação é promovida pela desoxigenação, pois sob condições apropriadas, moléculas de tamanho menor reassociam-se a moléculas inteiras de Hc na ligação do oxigênio e indica que a afinidade do oxigênio das moléculas de tamanho reduzido é menor que a afinidade das Hcs integras.

Na Figura 22A são apresentados os espectros de emissão de fluorescência da HcMac, em tampão pH 5,0 na presença de diferentes concentrações de ureia. Nota-se que com o aumento da adição de ureia, até 2,0 mol.L⁻¹, induz uma redução da intensidade de emissão de fluorescência. Acima de 2,0 mol.L⁻¹ de ureia nota-se que a intensidade de fluorescência aumentou (Figura 23B) e deslocou o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência de

330 nm para 342 nm (Figura 22C). Estes resultados corroboram com os dados de absorção óptica, onde observou-se maiores modificações nos espectros UV-vis para as mesmas concentrações de ureia (Figura 21A).

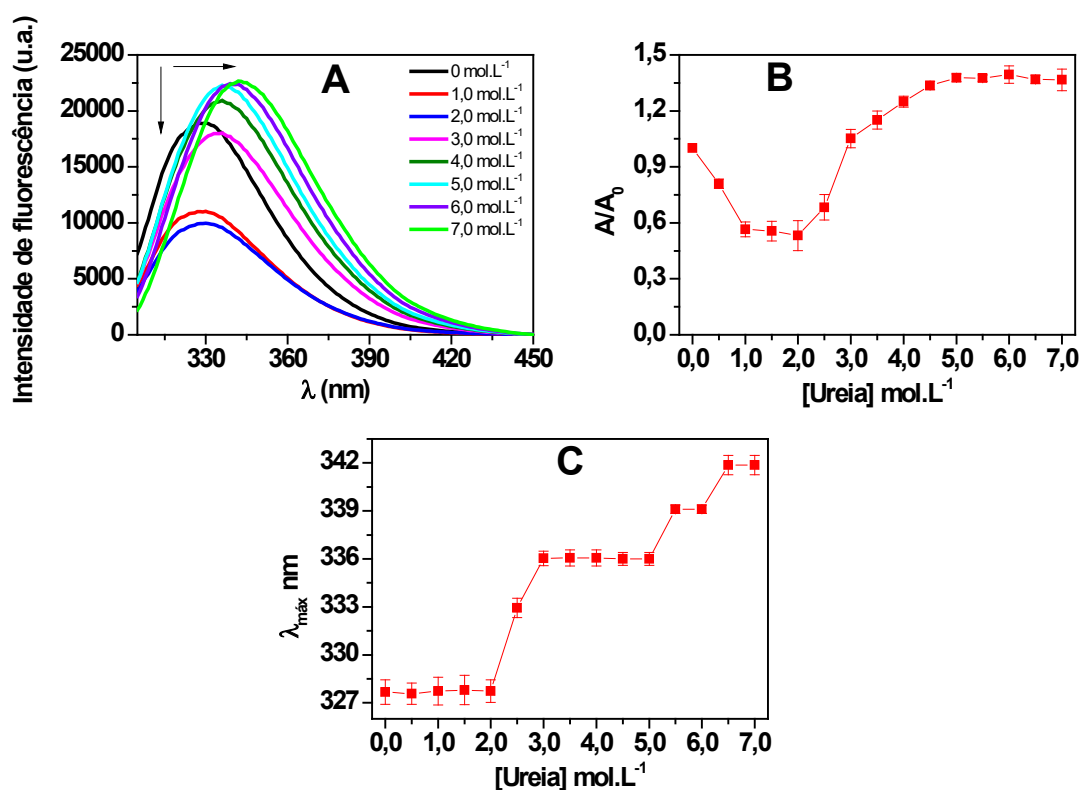


Figura 14 - (A) Espectros de fluorescência da HcMac 1,6 mg.mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato 20 mmol.L⁻¹ com o pH 5,0, em função da concentração de ureia. (B) Área total de emissão de fluorescência normalizada, dados obtidos da Figura 22A. (C) Comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência dos espectros da Figura 22A. As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 5 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

Este comportamento pode estar relacionado à maior exposição do centro metálico (centro di-cobre) da HcMac, devido a presença da ureia, que é um agente desnaturante e promove desenovelamento de proteínas (FRANCO, 2018). Assim, devido à maior exposição do cobre, que é um metal pesado paramagnético e supressor de fluorescência (LAKOVICZ, 2006), ocorre uma supressão de fluorescência dos Trp, reduzindo a emissão de fluorescência.

Na Figura 23A são mostrados os espectros de emissão de fluorescência da HcMac em função do aumento da concentração de ureia, em pH 7,0. Após a adição de 0,5 mol.L⁻¹ de ureia, observa-se uma redução da intensidade de emissão fluorescência até a concentração de 4,0 mol.L⁻¹. Em concentrações

superiores a $4,5 \text{ mol.L}^{-1}$ inicia-se um aumento na intensidade de emissão de fluorescência (Figura 23B) e seguido de um deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão para valores maiores, de 330 nm para 342 nm (Figura 23C).

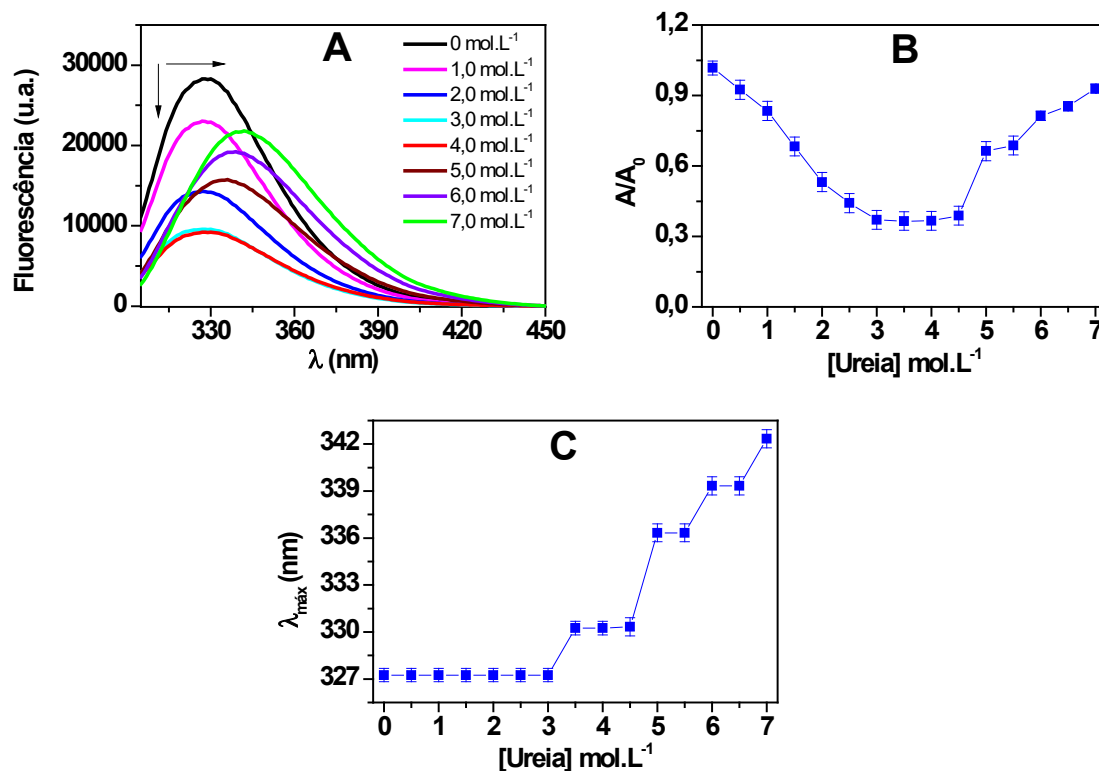


Figura 15 - (A) Espectros de fluorescência da HcMac $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato 20 mmol.L^{-1} com o pH 7,0, em função da concentração de ureia. (B) Área total de emissão de fluorescência normalizada, dados obtidos da Figura 23A. (C) Comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência dos espectros da Figura 23A. As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 5 medições diferentes, todas realizadas à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fonte: Autor (2022).

A forma deoxi-HcMac têm máximos de fluorescência em $333 \pm 1 \text{ nm}$. Esta mudança no $\lambda_{\text{máx}}$ emissão de fluorescência indica a remoção de átomos de cobre dos sítios ativos da Hc, e dissociação da hemoproteína em subunidades menores sem a presença de cobre, alterando o microambiente dos resíduos de Trp (COATES; NAIRN, 2014).

Na Figura 24A os resultados da HcMac na presença de ureia em pH 5,0, mostram uma diminuição da LSI de forma gradativa até a concentração de $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, após esta concentração a LSI mantém-se constante. Estes dados corroboram com os resultados das análises de fluorescência, o qual evidencia o processo de dissociação da proteína. Em pH 7,0 (Figura 24B), esta redução na

LSI ocorre entre as concentrações de 0,5 a 4,0 mol.L⁻¹ de ureia, e em concentrações superiores o valor da LSI permanece constante. Assim, os resultados nos mostram que a HcMac é menos estável em pH ácido, tornando-a mais sensível a presença do agente desnaturante.

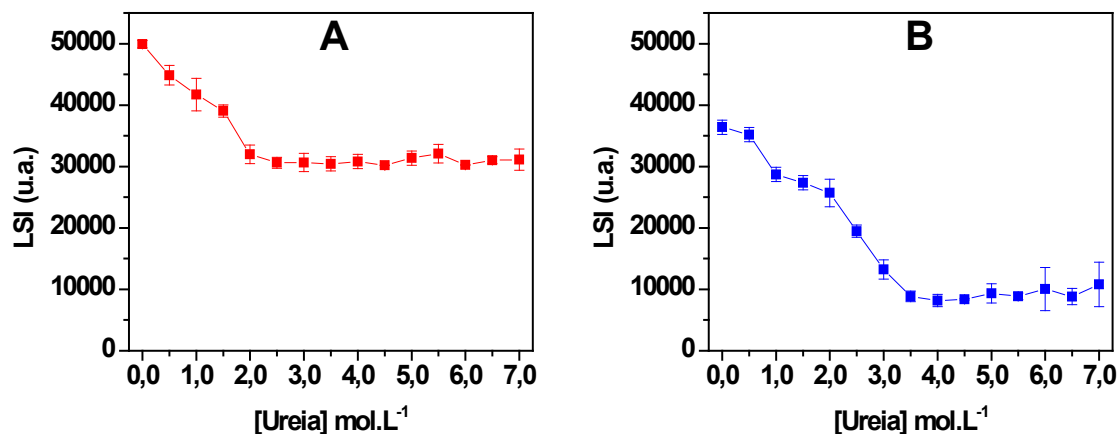


Figura 16 - Intensidade de espalhamento de luz em diferentes concentrações de ureia no pH 5,0 (A) e pH 7,0 (B). As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 5 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

4.7 Análises HcMac em função da concentração SDS nos valores de pH 7,0 e 5,0

Na Figura 25A são apresentados os espectros de absorção óptica da HcMac (1,6 mg.mL⁻¹) no pH 7,0 em função da concentração de SDS, após 3 horas de equilíbrio. Através das análises destes espectros observa-se um aumento da intensidade de absorção da banda do centro dicobre, em 340 nm (Figura 25B) para concentração de SDS entre 0 e 0,07 mmol.L⁻¹, sugerindo uma maior exposição do centro di-cobre ao solvente, favorecendo a presença de oxigênio.

Nas Figuras 25C e 25D é possível constatar que em concentrações superiores a 1,0 mmol.L⁻¹ de SDS ocorre uma redução na intensidade de absorção em 340 nm, significativamente, sugerindo a formação de deoxi-HcMac.

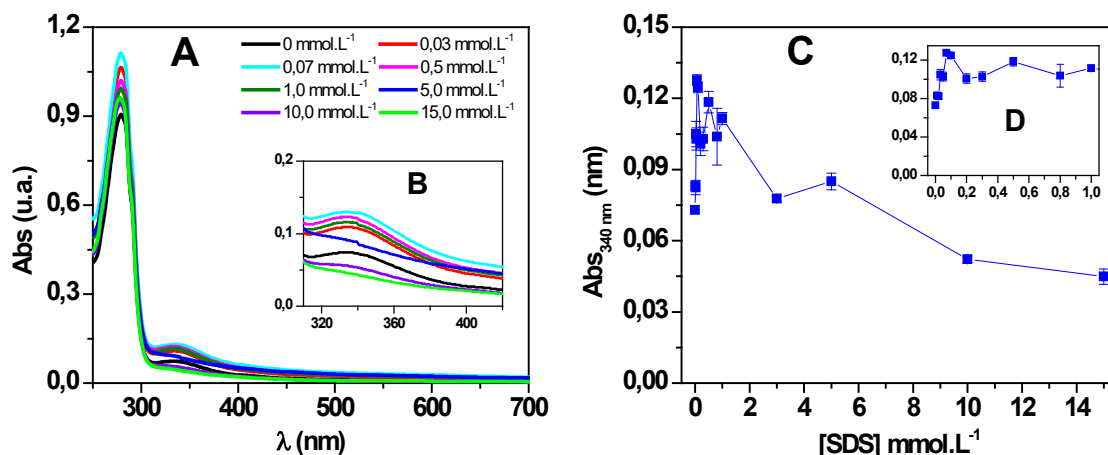


Figura 17 - (A) Espectro de absorção óptica da HcMac 1,6 mg.mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L⁻¹ pH 7,0, equilibrada por 3 horas, em função da concentração de SDS. (B) Inseto da Figura 25A, região da banda do centro di-cobre. (C) Inseto da Figura 25A, absorção em 340 nm. (D) Inseto da Figura 25C. As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 3 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

No pH 5,0 (Figura 26), em concentrações de SDS entre 0 - 0,1 mmol.L⁻¹, observou-se um aumento da intensidade de absorção dos espectros da HcMac devido ao espalhamento de luz presente nas amostras, fato este associado a formação de um complexo HcMac-SDS. A formação deste complexo pode estar relacionada com a forte interação da HcMac com cargas predominantes positiva em pH 5,0, com o SDS que apresenta carga negativa. Acima de 0,1 mmol.L⁻¹ de SDS ocorre uma redução da intensidade de absorção em 340 nm, alcançando um platô em 3,0 mmol.L⁻¹ de SDS.

Análises por espectroscopia de absorção óptica da HcMac em função da concentração de SDS após 24 horas de equilíbrio de preparo das amostras, são bastante similares aos encontrados após 3hs de equilíbrio (dados não mostrados).

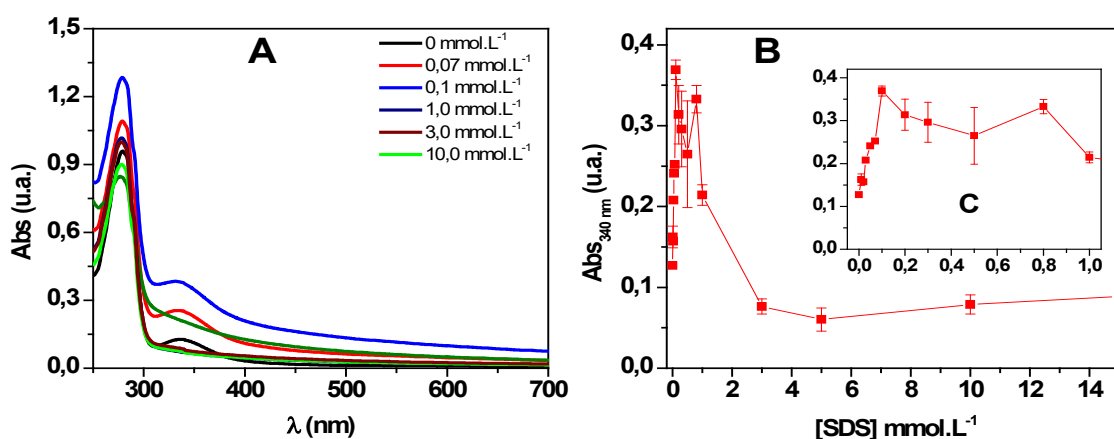


Figura 18 - (A) Espectro de absorção ótica da HcMac 1,6 mg.mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L⁻¹ pH 5,0, equilibrada por 3 horas, em função da concentração de SDS. (B) Inseto da Figura 26A, absorção em 340 nm. (C) Inseto da Figura 26C. As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 3 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

Na Figura 27A, em pH 7,0, observa-se uma diminuição da intensidade dos espectros de emissão de fluorescência até a concentração de 1,0 mmol.L⁻¹ de SDS, sem causar variações no λ_{max} de emissão (Figura 27C). Em concentrações superiores há uma ligeira redução na intensidade de fluorescência, que é acompanhada de um deslocamento do λ_{max} de emissão de 327 para 336 nm (Figura 27C).

Este deslocamento pode estar associado à mudança do meio, ou seja, o SDS pode provocar a dissociação da Hc, deixando o cobre livre na solução (COATES; NAIRN, 2014). Como o cobre é um metal pesado e paramagnético, este absorve a energia do Trp ocasionando a diminuição da fluorescência a partir do aumento da concentração de SDS. E o deslocamento do máximo de emissão de fluorescência está relacionado com o meio onde os Trp se localizam, ou seja, o deslocamento de 327 para 336 nm pode estar relacionado com uma maior exposição dos Trp pelo solvente aquoso.

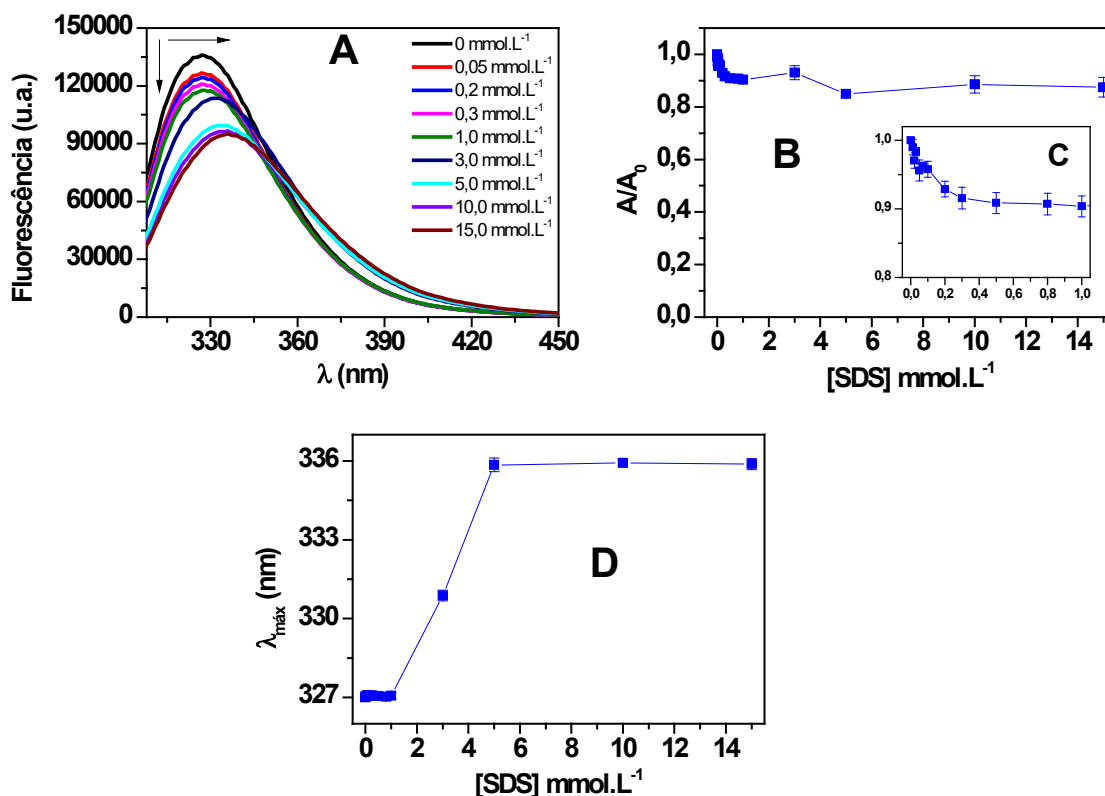


Figura 19 – (A) Espectros de fluorescência da HcMac (1,6 mg.mL⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L⁻¹ pH 7,0, equilibrada por 3 horas, em função da concentração de SDS. (B) Área total de emissão de fluorescência normalizada para o pH 7,0, dados obtidos da Figura 27A. (C) Inseto da Figura 27B. (D) λ_{max} de emissão de fluorescência dos espectros da Figura 27A. As barras de erro representam o desvio padrão (± SD) de 3 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

Em pH 5,0 para concentrações de SDS até 0,1 mmol.L⁻¹ observou-se uma redução da intensidade de emissão de fluorescência (Figuras 28A e 28C), com o λ_{max} de emissão em 327 nm. O aumento da concentração de SDS, acima de 0,1 mmol.L⁻¹ de SDS, desloca o λ_{max} de emissão para 336 nm (Figura 28D). Estes dados corroboram com os dados de absorção óptica, onde observou-se que, em pH 5,0, foi necessária uma menor concentração de surfactante (< 0,1 mmol.L⁻¹) para induzir mudanças mais drásticas na Hc em relação ao pH 7,0 (< 1,0 mmol.L⁻¹).

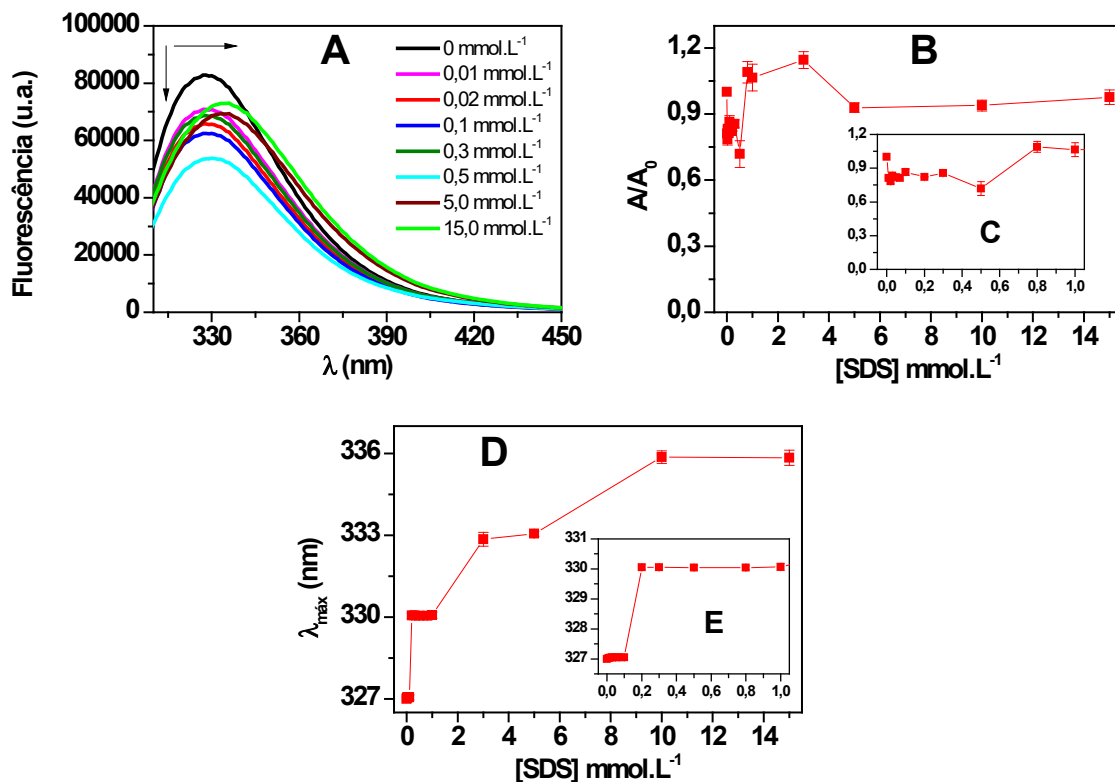


Figura 20 – (A) Espectros de fluorescência da HcMac (1,6 mg.mL⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L⁻¹ pH 5,0, equilibrada por 3 horas, em função da concentração de SDS. (B) Área total de emissão de fluorescência normalizada para o pH 7, dados obtidos da Figura 28A. (C) Inseto da Figura 28B. (D) $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência dos espectros da Figura 28A. As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 3 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

O máximo valor de LSI da HcMac pura em solução tampão, pH 7,0 (Figura 29A) pode estar relacionado à alta massa molecular da proteína em seu estado nativo (COATES; NAIRN, 2014). A adição de SDS diminui o valor de LSI, devido à dissociação da estrutura oligomérica em pequenas subunidades proteicas. No pH 5,0, a adição de SDS provoca um aumento da LSI até a concentração de 1,0 mmol.L⁻¹, devido a formação de um complexo HcMac-SDS. Em concentrações superiores de SDS a LSI diminui drasticamente (Figura 29B), devido a solubilização do complexo HcMac-SDS, seguida pela dissociação parcial da hemoproteína.

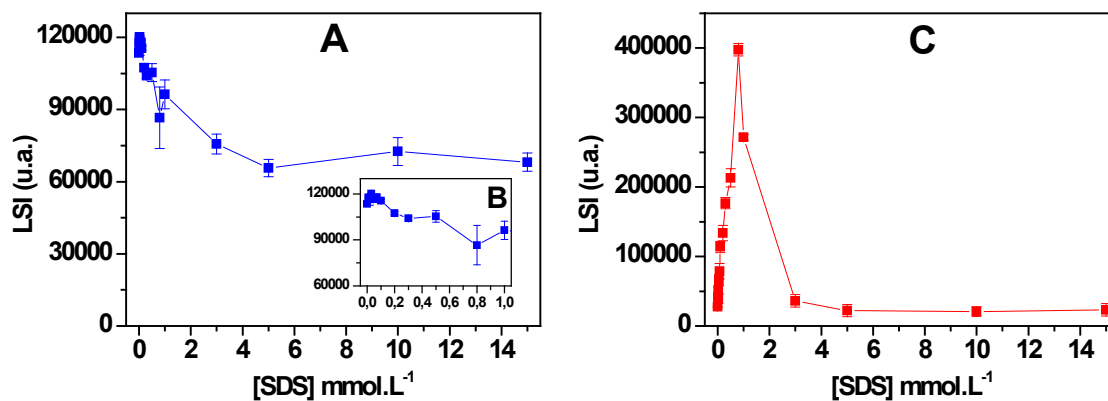


Figura 29 – LSI da HcMac (1,6 mg.mL⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato, em função da concentração de SDS em pH 7,0 (A) e no pH 5,0 (B). As barras de erro representam o desvio padrão (\pm SD) de 3 medições diferentes, todas realizadas à 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

Assim, a interação da HcMac com o surfactante SDS em valores de pH 5,0 e 7,0 induz o processo de oxidação do centro di-cobre, formando a deoxi-HcMac. Além disso, pode promover a dissociação da estrutura oligomérica da proteína, no qual causa a exposição dos resíduos de aminoácidos das cadeias polipeptídicas. O processo de dissociação da estrutura oligomérica da hemoproteína se mostrou mais sensível para o SDS em pH 5,0.

4.8 Ensaio de atividade biológica

A literatura reporta em vários estudos em que a hemocianina, presente na hemolinfa de artrópodes e moluscos, desempenha diferentes funções fisiológicas no organismo do animal. Principalmente como carreadora de O₂ e na defesa imunológica, em alguns casos se converte em uma enzima (PO) ou servindo como precursora de fragmentos peptídicos com ação antimicrobiana, ao fato de que estes animais não possuem memória imunológica.

Com base nessas informações, alguns estudos de caracterização focaram em compreender os processos que envolvem este tipo de mecanismo de ação imunológica (atividade biológica) e sua relação com a estrutura da Hc. Assim, foi reportado que tanto a Hc nativa purificada quanto suas subunidades podem apresentar atividade biológica. Tornando as Hcs importantes moléculas bioativas ou fonte de peptídeos bioativos na área da biotecnologia.

Em relação aos resultados dos testes de atividade biológica, neste trabalho, realizados com a HcMac nativa com os fungos *Candida neoformans* e *Candida albicans*, não demonstrou resultados significativos nos ensaios de MIC (concentração inibitória mínima), realizados (Tabela 1). Na coluna HcMac da Tabela 1, mostra que a Hc nativa não foi capaz de inibir nenhum dos fungos, ao fato que as drogas utilizadas como controle (Anfotericina B e Fluconazole) apresentaram valores de MIC dentro dos padrões esperados.

Tabela 1: Resultado MIC da HcMc em *C. neoformans* (ATCC 90112) e *C. albicans* (ATCC 90028).

	HcMac		Anfotericina B		Fluconazol	
	-	-				
<i>C. neoformans</i> (ATCC 90112)	-	-	0,125 µg/ml	0,0625µg/ml	1µg/ml	2 µg/ml
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	-	-	-	0,0313 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml

Fonte: Autor (2022).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das análises de atividade antibacteriana da HcMac nativa contra patógenos de peixes. Na coluna MIC, em atividade antimicrobiana, é possível observar que o valor da concentração máxima de Hc nativa utilizada (7932 µg/mL) não foi capaz de inibir nenhum dos patógenos utilizados.

Tabela 2: Atividade antibacteriana da HcMac contra patógenos dos peixes.

Cepa	Acesso ao GenBank	Patógeno	Hospedeiro	Isolamento		Atividade antibacteriana	
				Ano	Local	MIC	MBC
IP225	KU605565.1	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>O. niloticus</i>	2014	Reservatório de Ilha Solteira	>7932	-
ATCC 7966	NC_008570.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-	>7932	-
IP127	KU605547.1	<i>A. hydrophila</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	2012	Reservatório de Canoas II	>7932	-
T3R	MH591949.1	<i>A. hydrophila</i>	<i>O. niloticus</i>	2016	Caunesp	>7932	-
A124	KJ561033.1	<i>Aeromonas jandaei</i>	<i>O. niloticus</i>	2011	Arealva	>7932	-
GV1	MH155229.1	<i>A. jandaei</i>	<i>O. niloticus</i>	2017	Caunesp	>7932	-
IA04	MN134409.1	<i>A. jandaei</i>	<i>O. niloticus</i>	2019	Caunesp	>7932	-
IA07	MN133840.1	<i>A. jandaei</i>	<i>O. niloticus</i>	2019	Caunesp	>7932	-
54MS	KJ561092.1	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	2012	Dourados	>7932	-
LP15/3	MH155228.1	<i>C. freundii</i>	<i>Pterophyllum scalare</i>	2015	Caunesp	>7932	-
I3	-	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>O. niloticus</i>	2016	Caunesp	>7932	-
D115C	KU605571.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>O. niloticus</i>	2014	Nova Avanhandava	>7932	-
D151C	KX385295.1	<i>S. agalactiae</i>	<i>O. niloticus</i>	2016	Reservatório de Chavantes- Rio Paraná	>7932	-
A74	KJ560984.1	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>O. niloticus</i>	2011	Arealva	>7932	-
14MS	KJ560992.1	<i>L. garvieae</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	2012	Dourados	>7932	-

Fonte: Autor (2022).

Estes ensaios apresentados mostram que a HcMac não demonstrou capacidade em inibir o crescimento dos fungos *Candida albicans* e *Candida neoformans* e das bactérias *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas jandaei*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Lactococcus*

garviae e *Streptococcus agalactiae* diferente de outras Hcs nativas que apresentaram atividade antifúngica ou antibacteriana (PETIT, 2016).

Assim, como objetivos futuros do nosso grupo será sequenciar a HcMac e após a análise do transcriptoma identificar os peptídeos que apresentem atividade biológica, para posteriormente sintetiza-los e realizar os testes biológicos destes peptídeos sintéticos. Porém, isso não exclui a possibilidade de isolarmos fragmentos da HcMac que possam apresentar atividades biológicas, o que estaria de acordo com a literatura que reporta que as Hcs apresentam em suas cadeias polipeptídicas fragmentos de peptídeos antimicrobianos (LEE et al., 2004).

A análise de atividade PO na HcMac nativa, induzida pelo surfactante SDS após 5 minutos de incubação, foi determinada monitorando taxa de formação de dopacromo e derivados em 475 nm, por absorção ótica UV-vis. Nestes estudos não foi observada formação de dopacromo em concentrações de SDS inferiores ou igual a $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Figura 30A), mas em concentrações superiores a esta, iniciou-se um aumento nos valores de absorção em 475 nm (formação de dopacromo), em função do aumento da concentração de surfactante.

Assim, ocorre uma conversão da HcMac nativa em uma proteína de cobre enzimática (PO) induzida pelo SDS, e há dois intervalos na taxa de formação. O primeiro ocorre entre as concentrações de $0,1 - 0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de SDS, com valor de absorção em 475 nm próximo de 0,045. O segundo ocorre entre as concentrações de $0,5 - 1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de SDS, com um valor máximo de absorção em 475 nm próximo de 0,17, quase 3 vezes maior que o no primeiro intervalo (Figura 30A).

Na Figura 30B são apresentados os resultados da cinética relativa da conversão da HcMac nativa em PO, monitorando a formação de dopacromo em função do tempo. Estes dados mostram uma rápida e maior conversão de PO entre 0 - 6000 segundos, a partir deste tempo a velocidade de produção de PO é mais lenta, 4 vezes menos entre 6000 - 12000 segundos.

Neste ensaio inicial a HcMac demonstrou atividade PO na presença de cloridrato de dopamina, induzida pelo surfactante iônico SDS. Assim como outras hemocianinas de crustáceos, há maior formação de dopacromo

na concentração de 1,0 mmol.L⁻¹ de SDS, após 5 minutos de incubação (Figura 30A).

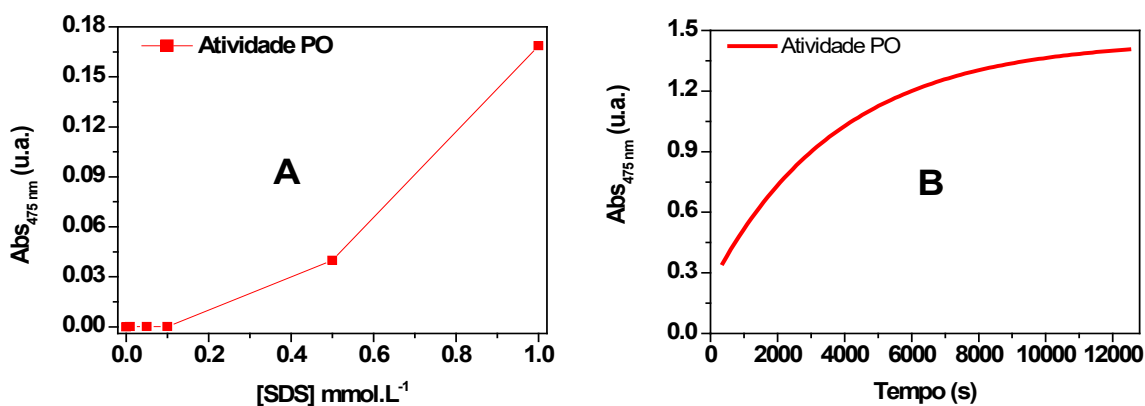


Figura 21 - (A) Indução da atividade PO da HMac nativa (0,1 mg.mL⁻¹) na presença de SDS (0 a 1,0 mmol.L⁻¹), após 5 minutos de incubação e a 25° C. (B) Cinética relativa da indução de PO na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de SDS, a 25 °C.

Fonte: Autor (2022).

A HcMac demonstrou maior sensibilidade ao SDS para conversão em PO em relação a outras Hcs de artrópodes. Baird e colaboradores (2007), avaliaram por absorção óptica UV-vis a atividade PO da Hc de *Limulus polyphemus*, *Pandinus imperator* e *Eurypelma californicum*, induzida por SDS e após 5 minutos de incubação. As Hcs de *E. californicum* e *P. imperator* iniciaram a conversão em PO a partir de 0,5 mmol.L⁻¹ de surfactante e *L. polyphemus* a partir de 0,7 mmol.L⁻¹. Ambas Hcs tiveram maiores concentrações de PO na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de SDS, assim com a HcMac.

5. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida para extração e purificação mostrou-se eficiente para obtenção da HcMac. Os estudos de caracterização estrutural (SDS-PAGE, MALDI-TOF e AUC), realizados até o momento, sugerem que a HcMac é constituída de cadeias monoméricas com MM de 75 e 76 kDa, que se agregam para formar 1×hexamero de 450 kDa, com um coeficiente de sedimentação de 19S, valores que estão próximos a de outras Hcs de crustáceos. Assim como não foram observadas espécies com valores de sedimentação inferior ou superior a 19S, o que indica uma alta homogeneidade

em solução de uma única espécie de HcMac. Diferente da Hc do camarão *Macrobachium rosenbergii* que apresenta, em géis de SDS-PAGE, monômeros, dímeros e trímeros.

Os resultados das análises espectroscópicas em função de diferentes valores de pH, sugerem que a HcMac possui de *pI* ácido (entre 4,3 - 5,3) e que apresenta maior afinidade por oxigênio em valores próximos de pH 4,4 e acima pH 8,0, à 25 °C, semelhante ao de outras Hcs. A alteração nos valores de pH provocou desdobramento na proteína e modificações no centro metálico, o que interferiu na exposição do resíduo de Trp ao solvente.

Nas análises espectroscópicas em função da concentração de ureia, a HcMac mostrou-se mais sensível ao desnaturante em pH ácido (pH 5,0), sendo necessário uma concentração superior a 2,0 mol.L⁻¹ de ureia para induzir o processo de desnaturação da proteína. Enquanto que em pH 7,0, foi necessária uma concentração acima de 4,0 mol.L⁻¹.

Constatou-se um comportamento semelhante na presença do surfactante SDS, o qual teve uma maior interação com a proteína no valor de pH 5,0. Em concentração igual ou inferior a 2,0 mmol.L⁻¹ de surfactante, ocorreu a formação de agregados, enquanto em valor de pH 7,0 não ocorre este tipo de interação acentuada, mesmo em concentrações superiores a esta.

A presença de ureia e de SDS, em solução, promoveram alterações na estrutura terciária da HcMac, assim como valores de pH ácidos, estes agentes induziram, possivelmente, o processo de dissociação da hemoproteína e causaram mudanças na estruturais na proteína. Fato observado na exposição do resíduo de Trp ao solvente nas análises de fluorescência.

A HcMac na sua forma nativa purificada não apresentou atividade antimicrobiana nos ensaios realizados. Assim como outras Hcs de crustáceos a HcMac apresentou atividade PO induzida pelo surfactante SDS, na presença de dopamina, com maior formação de PO na concentração de 1,0 mmol.L⁻¹ de surfactante. O que pode ser um indício da função imunológica deste hemoproteína.

Perspectivas

Durante o desenvolvimento dessa pesquisa, foram obtidas informações sobre a estrutura molecular HcMAc, o seu comportamento frente aos processos de oxidação/dissociação oligomérica e desnaturação, na presença do surfactante iônico SDS e do agente desnaturante ureia, 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.

É importante salientar, que uma parcela dos estudos que seriam realizados, como o processo de dissociação/agregação da HcMac e ensaio de atividade biológica com as subunidades monoméricas da mesma, não avançou devido à pandemia provocada pelo Covid-19. Assim, estudos complementares a estes apresentados, como dicroísmo circular (para avaliar a estrutura secundária), espalhamento de luz dinâmico e SAXS (para avaliar o tamanho, forma da molécula e estabilidade da estrutura oligomérica) e microscopia eletrônica de varredura da HcMac em diferentes valores de pH, diferentes concentrações de surfactantes e ureia serão fundamentais para avançar na caracterização biofísica desta proteína. Portanto, estudos 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 compreender melhor os processos de oxidação/dissociação, re-associação e desnaturação desta Hc extracelular.

Vale salientar que estudos sobre o sequenciamento de cDNA da HcMac são de bastante relevância, tendo como intuito elucidar a sua estrutura primária, além da identificação, síntese química e caracterização de peptídeos com atividade biológica, que porventura possam apresentar um potencial antimicrobiano. Além disso, poderão ser realizados estudos biofísicos e computacionais a respeito da interação dos peptídeos sintetizados com modelos de membranas biológicas. Este estudo possibilitará investigar as diferenças biológicas e estruturais de diferentes Hcs, nas diferentes condições avaliadas,

bem como avaliar o potencial desta classe de proteínas, identificando peptídeos bioativos, contribuindo assim para um avanço importante nas aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, K.; ENDO, H.; WATANABE, T.; NISHIOKA, T.; & HIRATA, T. Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: Enzymatic properties and immunolocalization. **Pigment Cell Research**, v. 18, p. 136-143, 2005a.
- ADACHI, K.; HIRATA, T.; NAGAI, K.; FUJISAWA, S.; KINOSHITA, M.; SAKAGUCHI, M. Purification and characterization of prophenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). **Fisheries Sci**, v. 65, n. 6. p. 919-925, 1999a.
- ADACHI, K.; HIRATA, T.; NAGAI, K.; SAKAGUCHI, M. Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 8, p. 1130-1136, 2001.
- ADACHI, K.; HIRATA, T.; NISHIOKA, T.; SAKAGUCHI, M. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.134, n. 1, p. 135-141, 2003.
- ADACHI, K.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; MIYAMOTO, N.; KOKUBO, T.; HIRATA, T. An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanina synthesis. **Pigment Cell Research**, v. 19, p. 214-219, 2005b.
- ALI, M. T.; GLEESON, R. A.; WEI, C. I.; MARSHALL, M. R. Activation mechanism of prophenoloxidase on melanosis development in Florida spiny lobster (*Panulirus argus*) cuticle. **J Food Sci**, v. 59, n. 5, p. 1024-1030, 1994b.
- ALI, M. T.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. I.; GLEESON, R. A. Monophenol oxidase activity from the cuticle of Florida spiny lobster (*Panulirus argus*). **J Agric Food Chem**, v. 42, n. 1, p. 53-58, 1994a.
- ANTONOVA, O.; DOLASHKA, P.; TONCHEVA, D.; RAMMENSEE, H. G.; FLOETENMEYER, M.; STEVANOVIC, S. In vitro antiproliferative effect of *Helix aspersa* hemocyanin on multiple malignant cell lines. **Z Naturforsch C**, v. 69, p. 325-34, 2014.
- ARANCIBIA, S.; SALAZAR, F.; BECKER, M. I. Hemocyanins in the immunotherapy of superficial bladder cancer. In: Canda A, editor. Bladder cancer – from basic science to robotic surgery. **Croatia: In Tech Open, Chapter 11**, p. 221-242, 2012.
- ARISAKA, F.; VAN HOLDE, K. E. Allosteric properties and the association equilibria of hemocyanin from *Callinassa californiensis*. **Journal Molecular Biology**, v. 134, p. 41-73, 1979.
- ASHIDA, M.; BREY, P. T. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey PT, Hultmark D, editors. Molecular mechanism of immune responses in insects. **London: Chapman and Hall**, p. 135-172, 1997.
- ASPAN, A.; HUANG, T.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 4, p. 939-943, 1995.

BAGASRA O.; FORMAT, L. J.; HOWEEDY, A.; WHITTLE, P. A protein vaccine for cocaine abuse prophylaxis, **Immunopharmacology**, v. 23, p. 173-179, 1992.

BAIRD, S.; KELLY, S. M.; PRICE, N. C.; JAENICKE, E.; MEESTERS, C.; NILLIUS, D.; DECKER, H.; NAIRN, J. Hemocyanin conformational changes associated with SDS-induced phenoloxidase activation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1774, n. 11, p. 1380-1394, 2007.

BECK, A.; HILLEN, N.; DOLASHKI, A.; STEVANOVIC, S.; SALVATO, B.; VOELTER, W.; DOLASHKA-ANGELOVA, P. Oligosaccharide structure of a functional unit RvH1-b of *Rapana venosa* hemocyanin using HPLC/electrospray ionization mass spectrometry. **Biochimie**, v. 89, p. 938-949, 2007.

BENNION, B. J.; DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 9, p. 5142-5147, 2003.

BERTINI, G.; VALENTI, W.C. Importância econômica dos camarões de água doce. In: Silva, R.B, Ming, L.C, eds. *Relatos de pesquisas e outras experiências vividas no Vale do Ribeira*, Jaboticabal: **FUNEP**, p.155-170. 2010.

BETTING, D. J.; UM, X. Y.; KAFI, K.; MCDONNELL, D.; ROSAS, F.; GOLD, D. P.; TIMMERMAN, J. M. Enhanced immune stimulation by a therapeutic lymphoma tumor antigen vaccine produced in insect cells involves mannose receptor targeting to antigen presenting cells. **Vaccine**, v. 27, p. 250-259, 2009.

BOYANOVA, O.; DOLASHKA, P.; TONCHEVA, D.; et al. In vitro effect of molluscan hemocyanins on CAL-29 and T-24 bladder cancer cell lines. **Biomed Rep.** V. 1, n. 2, 235-238, 2013.

BRUNEAUX, M.; TERRIER, P.; LEIZE, E.; MARY, J.; LALLIER, F. H.; & ZAL, F. Structural study of *Carcinus maenas* hemocyanin by native ESI-MS: Interaction with l-lactate and divalent cations. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 77, n. 3, p. 589-601, 2009.

BURMESTER, T. Evolution and adaptation of hemocyanin within spider. In: Nentwin, W. (ed) *Spider ecophysiology*. Berlin: **Springer Science**, p. 529, 2013.

BURNETT, L. E.; SCHOLNICK, D. A.; MANGUM, C. P. Temperature sensitivity of molluscan and arthropod hemocyanins. **Biological Bulletin - Marine Biological Laboratory Woods Hole**, v. 174, p. 153-162, 1988.

CARRUTHERS, L. M.; SCHIRF, V. R.; DEMELER, B.; HANSEN, J. C. Sedimentation velocity analysis of macromolecular assemblies. **Methods in Enzymology – Numerical Computer Methods, Part C**, v. 321, p. 66-80, 2000.

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, 2013.

CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of

Glossosco-lex paulistus (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2144-2151, 2011.

CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends Immunol.** V. 29, p. 263-271, 2008.

CERRUTTI, B. M.; MORAES, M. L.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V. Lignin as immobilization matrix for HIV p17 peptide used in immunosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 71, p. 420–426, 2015.

CHEN J. C.; CHEN C. T.; CHENG S. Y. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambiente ammonia-N at different salinity levels. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 110, p. 85-94, 1994a.

CHEN J. C.; CHENG S. Y.; CHEN C. T. Changes of haemocynin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambiente ammonia. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 109A, p. 339-347, 1994b.

CHEN, S. C.; LIN, Y. D.; LIAW, L. L.; WANG, P. C. *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.45, p. 45-52, 2001.

CHENG, W.; CHEN, J. C. Isolation and characterization of an *Enterococcus* like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii* in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 34, p. 93-101, 1998.

CHIKH, L.; TESSIER, M.; FRADET, A. NMR and MALDI-TOF MS study of side reactions in hyperbranched polyesters based on 2, 2-bis (hydroxymethyl) propanoic acid. **Polymer**, v. 48, n. 7, p. 1884-1892, 2007.

CHIKH, L.; TESSIER, M.; FRADET, A. Polydispersity of hyperbranched polyesters based on 2, 2-Bis (hydroxymethyl) propanoic Acid: SEC/MALDI- TOF MS and ¹³C NMR/Kinetic-Recursive Probability Analysis. **Macromolecules**, v. 41, n. 23, p. 9044-9050, 2008.

CLSI. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; **Approved Guideline** - Second Edition. *CLSI Document VET04-A2*, (June), 2014.

COATES, C. J.; KELLY, S. M.; NAIRN, J. Possible role of phosphatidylserine hemocyanin interaction in the innate immune response of *Limulus polyphemus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 155-163, 2011.

COATES, C. J.; NAIRN, J. Diverse immune functions of hemocyanins. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 45, n. 1, p. 43-55, 2014.

COATES, C. J.; NAIRN, J. Hemocyanin-derived phenoloxidase activity: a contributing factor to hyperpigmentation in *Nephrops norvegicus*. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1, p. 361-369, 2013.

COATES, C. J.; WHALLEY, T.; WYMAN, M.; NAIRN, J. A putative link between phagocytosis-induced apoptosis and hemocyanin derived phenoloxidase activity. **Apoptosis**, v. 18, p. 1319-1331, 2013.

COLE, J. L.; LARY, J. W.; MOODY, T. P.; LAUE, T. M. Analytical ultracentrifugation: Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. **Methods in Cell Biology - Biophysical Tools for Biologists, volume One: In Vitro Techniques**, v. 84, p. 143-179, 2008.

CUFF, M. E.; MILLER K. I.; VAN HOLDE, K. E.; HENDRICKSON, W. A. Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin, **J. Mol. Biol.** v. 278, p. 855-870, 1998.

DE GRAVE, S.; FRANSEN, C. H. J. M. Carideorum Catalogus: the recent species of the dendrobranchiate, stenopodidean, procarididean and caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zool. Meded.**, v. 85, n. 9, p.195-588, 2011.

DECKER, H.; HELLMANN, N.; JAENICKE, E.; LIEB, B.; MEISSNER, U.; MARKL, J. Minireview: Recent progress in hemocyanin research. **Integrative and Comparative Biology**, v. 47, p. 631-644, 2007.

DECKER, H.; JAENICKE, E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 7, p. 673-687, 2004.

DECKER, H.; RIMKE, T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25889-25892, 1998.

DECKER, H.; RYAN, M.; JAENICKE, E. SDS-induced phenoloxidase activity in hemo-cyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum* and *Cancer magister*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 21, p. 17796-17799, 2001.

DECKER, H.; TERWILLIGER, N. O. R. A. Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 12, p. 1777-1782, 2000.

DEMELER, B.; BROOKES, E. Monte Carlo analysis of sedimentation experiments. **Colloid and Polymer Science**, v, 286, n. 2, p. 129-137, 2007.

DESTOUMIEUX-GARZON, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P.; BACHERE, E. Crustacean immunity-antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47070-47077, 2001.

DOLASHKA, P. et al. Antitumor activity of glycosylated molluscan hemocyanins via Guerin ascites tumor. **Immunological Investigations**, v. 40, n. 2, p. 130-149, 2011.

DOLASHKA, P. et al. Glycan structures and antiviral effect of the structural subunit RvH2 of *Rapana* hemocyanin. **Carbohydrate research**, v. 345, n. 16, p. 2361-2367, 2010.

DOLASHKA, P.; DOLASHKI, A.; VAN BEEUMEN, J.; FLOETENMEYER, M.; VELKOVA, L.; STEVANOVIC, S.; VOELTER, W. Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from *Helix* and *Rapana snails*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 263-270, 2016.

DOLASHKA, P.; DOLASHKI, A.; VELKOVA, L.; STEVANOVIC, S.; MOLIN, L.; TRALDI, P.; VELIKOVA, R.; VOELTER, W. Bioactive compounds isolated from garden snails. **Journal of Bioscience and Biotechnologies**, p. 147-155, 2015.

DOLASHKA, P.; GENOV, N.; PARVANOVA, K.; VOELTER, W.; GEIGER, M.; STOEVA, S. *Rapana thomasiana grosse* (gastropoda) haemocyanin: spectroscopic studies of the structure in solution and the conformational stability of the native protein and its structural subunits. **Biochemical Journal**, v. 315, n. Pt 1, p. 139-144, 1996.

DOLASHKA-ANGELOVA, P. et al. Oligomeric stability of *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) and its structural subunits. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1646, n. 1-2, p. 77-85, 2003.

DOLASHKA-ANGELOVA, P.; LIEB, B.; VELKOVA, L.; HEILEN, N.; SANDRA, K.; NIKOLAEVA-GLOMB, L.; DOLASHKI, A.; GALABOV, A. S.; VAN BEEUMEN, J.; STEVANOVIC, S.; VOELTER, W.; DEVREESE, B. Identification of glycosylated sites in *Rapana* hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence, and their antiviral effect. **Bioconjugate chemistry**, v. 20, n. 7, p. 1315-1322, 2009.

DOLASHKA-ANGELOVA, P.; SCHICK, M.; STOEVA, S.; VOELTER, W. Isolation and partial characterization of the N-terminal functional unit of subunit Rth1 from *Rapana thomasiana grosse* hemocyanin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, n. 5, p. 529-538, 2000.

DOLASHKA-ANGELOVA, P.; STEFANOVA, T.; LIVANIOU, E.; et al. Immunological potential of *Helix vulgaris* and *Rapana venosa* hemocyanins. **Immunological Investigations**, v. 37, n. 8, p. 822-840, 2008.

DOLASHKA-ANGELOVA, P.; STEVANOVIC, S.; DOLASHKI, A.; DEVREESE, B.; TZVETKOVA, B.; VOELTER, W.; VAN BEEUMEN, J.; SALVATO, B. A challenging insight on the structural unit 1 of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 459, n. 1, p. 50-58, 2007.

DOLASHKI, A.; VELKOVA, L.; ATANASOV, B.; VOELTER, W.; STEVANOVIC, S.; SCHWARZ, H.; DI MURO, P.; DOLASHKA-ANGELOVA, P. Reversibility and "pH-T phase diagrams" of *Rapana venosa* hemocyanin and its structural subunits. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 11, p. 1617-1624, 2008.

DURSTEWITZ, G.; TERWILLIGER, N.B. cDNA cloning of a developmentally regulated hemocyanin subunit in the crustacean *Cancer magister* and phylogenetic analysis of the hemocyanin gene family. **Molecular biology and evolution**, v. 14, n. 3, p. 266-276, 1997.

ELLERTON, H. D.; ANDERSON, D. M. Subunit structure of the hemocyanin from the prawn *Penaeus monodon*. In: **Invertebrate Oxygen Binding Proteins**. (J. Lamy and J. Lamy, ed.). Marcel Dekker, New York, p. 159-169, 1981.

FAO. (2019). Fishery and Aquaculture Statistics. [Global Aquaculture Production 1950-2016] (FishStatJ). Rome, Italy: **FAO Fisheries and Aquaculture Department**. [online].

FIGUEROA-SOTO, C. G.; CALDERON DE LA BARCA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L.; HIGUERA-CIAPARA, I.; VEPIZ-PLASCENCIA, G. Purification of hemocyanin from white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone) by immobilized metal affinity chromatography. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 117, n. 2, p. 203-208, 1997.

FLAMM, J.; BUCHER, A.; HOLTL, W.; ALBRECHT, W.; Recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy. A prospective randomized trial, **The Journal of urology**, v. 144, n. 2, p. 260-263, 1990.

FRANCO, J. C. Clonagem, expressão, purificação e caracterização da proteína Hsp110 de sorgo visando à compreensão do sistema de desagregação de proteínas em plantas. **UNICAMP, Instituto de Química, Campinas, SP**. p. 103. 2018.

FUJIMOTO, K.; OKINO, N.; KAWABATA, S.; IWANAGA, S.; OHNISHI, E. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 17, p. 7769-7773, 1995.

GARCIA-CARRENO, F. L.; COTE, K.; NAVARRETE DEL TORO, M. A. Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg-shrimp *Penaeus vannamei*: Conversion, characterisation of catalytic properties, and role in post mortem melanosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6454-6549, 2008.

GATSOGIANNIS, C.; HOFNAGEL, O.; MARKL, J.; RAUNSER, S. Structure of mega-hemocyanin reveals protein origami in snails. **Structure**, v. 23, p. 93-103, 2015.

GATSOGIANNIS, C.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin: the 9 Å CryoEM structure and molecular model of the KLH1 dodecamer reveal the interfaces and intricate topology of 160 functional units. **J Mol Biol**, v. 385, p. 963-983, 2009.

GAYKEMA, W. P. J.; HOL, W. G. J.; VEREIJKEN, J. M.; SOETER, N. M.; BAK, H. J.; BEINTEMA, J. J. 3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin. **Nature**, v. 309, p. 23-29, 1984.

GEBAUER, W.; HARRIS, J. R.; GEISTHARDT, G.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin type 2 (KLH2): detection and immunolocalization of a labile functional unit h. **J Struct Biol**, v. 128, p. 280-286, 1999b.

GEBAUER, W.; HARRIS, J. R.; HEID, H.; SÜLING, M.; HILLENBRAND, R.; SÖHNGEN, S.; WEGENER-STRAKE, A.; MARKL, J. Quaternary structure, subunits and domain patterns of two discrete forms of keyhole limpet hemocyanin: KLH1 and KLH2. **Zoology**, v. 98, p. 51-68, 1994.

GEBAUER, W.; HARRIS, J. R.; MARKL, J. Topology of the 10 subunits within the decamer of KLH, the hemocyanin of the marine gastropod *Megathura crenulata*. **J Struct Biol**, v. 139, p. 153-159, 2002.

GESHEVA, V.; CHAUSHEVA, S.; MIHAYLOVA, N. et al. Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma. **BMC Immunol**, v. 15, p. 34-44, 2014.

GESHEVA, V.; CHAUSHEVA, S.; STEFANOVA, N. et al. *Helix Pomatia* hemocyanin - a novel bio-adjuvant for viral and bacterial antigens. **Int Immunopharmacol**, v. 26, n. 1, p. 162-168, 2015.

GEYER, H.; WUHRER, M.; RESEMANN, A.; GEYER, R. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. **J Biol Chem**, v. 280, p. 40731-40748, 2005.

GLAZER, L.; TOM, M.; WEIL, S.; ROTH, Z.; KHALAILA, I.; MITTELMAN, B.; SAGI, A. Hemocyanin with phenoloxidase activity in the chitin matrix of the crayfish gastro-lith. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 10, p. 1898-1904, 2013.

GOLDFEDER, M.; EGOZY, M.; BEN-YOSEF, V.S.; ADIR, N.; FISHMAN, A. Changes in tyrosinase specificity by ionic liquids and sodium dodecyl sulfate. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 1953-1961, 2013.

HALL, M.; SCOTT, T.; SUGUMARAN, M.; SÖDERHÄLL, K.; LAW, J. H. Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: Purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n.17, p. 7764-7768, 1995.

HARIHARAN, A.; CHELLI, S. M.; MUTHUKUMAR, V. S.; BELLIRAJ, S. K.; FERRARIE, M.; NARASIMH, N. K.; VISHNUBHATLA, K. C. Paper-microfluidics based SERS substrate for PPB level detection of catechol. **Optical Materials**. v. 94, p. 305-310, 2019.

HARRIS, J. R.; GEBAUER, W.; ADRIAN, M.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): slow in vitro reassociation of KLH1 and KLH2 from Immucothel. **Micron**, v. 5, p. 329-339, 1998.

HARRIS, J. R.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. **Micron**, v. 30, p. 597-623, 1999.

HARRIS, J. R.; SCHEFFLER, D.; GEBAUER, W.; LEHNERT, R.; MARKL, J. *Haliotis tuberculata* hemocyanin (HtH): analysis of oligomeric stability of HtH1 and HtH2 and comparison with keyhole limpet hemocyanin KLH1 and KLH2. **Micron**, v. 31, p. 613-622, 2000.

HARTMANN, H.; DECKER, H. Small-angle scattering techniques for analyzing conformational transitions in hemocyanins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2004. p. 81-106.

HARTMANN, H.; LOHKAMP, B.; HELLMANN, N.; DECKER, H. The allosteric effector l-lactate induces a conformational change of 2×6-meric lobster hemocyanin in the oxy state as revealed by small angle x-ray scattering. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19954-19958, 2001.

HARVEY, D. J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. **Mass spectrometry reviews**, v. 18, n. 6, p. 349-450, 1999.

HAZES B.; MAGNUS, K. A.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; DAUTER, Z.; KALK, K. H.; HOL, W. G. J. Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a

mechanism for allosteric regulation. **Protein Science**, v. 2, n. 4, p. 597-619, 1993.

HERSKOVITS, T. T.; HAMILTON, M. G. (1991), Higher order assemblies of molluscan hemocyanins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 99, n. 1, p. 19-34, 1991.

HILLENKAMP, F.; KARAS, M. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 200, n. 1-3, p. 71-77, 2000.

JAENICKE, E.; DECKER, H. Tyrosinases from crustaceans form hexamers. **Biochemical Journal**, v. 371, n. 2, p. 515-523, 2003.

JAENICKE, E.; FÖLL, R.; DECKER, H. Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 48, p. 34267-34271, 1999.

JIANG, H.; WANG, Y.; KANOST, M. R. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12220-12225, 1998.

JIANG, N.; TAN, N. S.; HO, B.; DING, J. L. Respiratory protein generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. **Nature Immunology**, v. 8, p. 1114-1122, 2007.

JURINCIC, C. D.; ENGELMANN, U.; GASCH, J.; KLIPPEL, K. F. Immunotherapy in bladder cancer with keyhole-limpet hemocyanin: a randomized study. **The Journal of urology**, v. 139, n. 4, p. 723-726, 1988.

KAHN, J. O.; STITES, D.P.; SERLLIAN, J.; MURCAR, N.; STRYKER, R.; VOLBERDING, P. A.; NAVLOR, P. H.; GOLDSTEIN, A. L.; SARIN, P. S.; SIMMON, V. F. A phase I study of HGP-30, a 30 amino acid subunit of the human immunodeficiency virus (HIV) p17 synthetic peptide analogue sub-unit vaccine in seronegative subjects. **AIDS research and human retroviruses**, v. 8, n. 8, p. 1321-1325, 1992.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F. KARAS, Michael et al. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. **International journal of mass spectrometry and ion processes**, v. 78, p. 53-68, 1987.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; HILLENKAMP, F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. **Analytical chemistry**, v. 57, n. 14, p. 2935-2939, 1985.

KAWABATA, T.; YASUHARA, Y.; OCHIAI, M.; MATSUURA, S.; ASHIDA, M. Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 17, p. 7774-7778, 1995.

KELLER, H.; LIEB, B.; ALTENHEIN, B.; GEBAUER, D.; RICHTER, S.; STRICKER, S.; MARKL, J. Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1) organization of the \approx 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its

- functional units f, g and h. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 1, p. 27-38, 1999.
- KHAYAT, M.; FUNKENSTEIN, B.; TIETZ, A.; LUBZENS, E. In vivo, in vitro and cell-free synthesis of hemocyanin in the shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, n. 1, p. 31-38, 1995.
- KIM, J. H.; LEE, Y.; BAE, Y. S.; KIM, W. S.; KIM, K.; IM, H. Y.; KANG, W. K.; PARK, K.; CHOI, H. Y.; LEE, H. M.; BAEK, S. Y.; LEE, H.; DOH, H.; KIM, B. M.; KIM, C. Y.; JEON, C.; JUNG, C. W. Phase I/II study of immunotherapy using autologous tumor lysate-pulsed dendritic cells in patients with metastatic renal cell carcinoma. **Clinical Immunology**, v. 125, n. 3, p. 257-267, 2007.
- KUBALLA, A. V.; HOLTON, T. A.; PATERSON, B.; ELIZUR, A. Moulting cycle specific differential gene expression profiling of the crab *Portunus pelagicus*. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 147, 2011.
- KUTTY, M. N.; HERMAN, F.; LE MENN, H. Culture of other prawn species. **Freshwater prawn culture: the farming of Macrobrachium rosenbergii**, p. 393-410, 2000.
- LAKOWICZ, 2006. - LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Springer, p. 974. 2006.
- LAMM, D. L. Laboratory and clinical experience with keyhole limpet hemocyanin (Immucothel) in superficial bladder cancer. **Journal für Urologie und Urogynäkologie**, v. 10, n. 2, p. 13-16, 2003.
- LATTOVÁ, E.; CHEN, V. C.; VARMA, S.; BEZABEH, T.; PERREAULT, H. Matrix-assisted laser desorption/ionization on-target method for the investigation of oligosaccharides and glycosylation sites in glycopeptides and glycoproteins. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 10, p. 1644-1650, 2007.
- LAUE, T. Biophysical studies by ultracentrifugation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 5, p. 579-583, 2001.
- LAUE, T. M.; STAFFORD, W. F. Modern applications of analytical ultracentrifugation. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 28, p. 75-100, 1999.
- LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science - a tutorial review. **Protein Science**, v. 11, n. 9, p. 2067-2079, 2002.
- LEE, S. Y.; CHO, M. Y.; HYUN, J. H.; LEE, K. M.; HOMMA, K.; NATORI, S.; KAWABATA, S.; IWANAGA, S.; LEE, B. L. Molecular cloning of cDNA for prophenol-oxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1, 3- β -glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. **European journal of biochemistry**, v. 257, n. 3, p. 615-621, 1998.

LEE, S. Y.; LEE, B. L.; SODERHALL, K. Processing of an anti-bacterial peptide form hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 7927-7933, 2003.

LEE, S. Y.; LEE, B. L.; SODERHALL, K. Processing of an antimicrobial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 7927-7933, 2003.

LEE, S. Y.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, n. 2, p. 490-496, 2004.

LEI, K.; LI, F.; ZHANG, M.; YANG, H.; LUO, T.; XU, X. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n.7, p. 808-813, 2008.

LIEB, B.; ALTENHEIN, B.; MARKL, J. The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5675-5681, 2000.

LIEB, B.; GEBAUER, W.; GATSOGIANNIS, C.; DEPOIX, F.; HELLMANN, N.; HARASEWYCH, M. G, et al. Molluscan mega-hemocyanin: an ancient oxygen carrier tuned by a ~550 kDa polypeptide. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2010.

LIEB, B.; MARKL, J. Evolution of molluscan hemocyanins as deduced from DNA sequencing. **Micron**, v. 35, p. 117-119, 2004.

LIMA, J. A. L. A. A.; ROCHA, C. A. R. N. A.; SOUZA, G. R. D. S. R.; GAMA, R. D. S. G. S.; LIMA, R. P. L. P.; FREITAS, I. S. D. F. S.; CARVALHO, L. S.; AMORIM, T. S.; GUERRA, J. D. A. G. A. Diferentes corretivos na água de cultivo do camarão *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 12, n.1, p. 17-24, 2019.

LINZEN, B.; SOETER, N.M.; RIGGS, A.F.; SCHNIEDER, H.J.; SCHARTAU, W. The structure of arthropod hemocyanins. **Science**, v. 229, p. 519-524, 1985.

LIU, G.; YANG, L.; FAN, T.; CONG, R.; TANG, Z.; SUN, W.; et al. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 47-57, 2006.

LIU, S.; AWEYA, J. J.; ZHENG, L.; WANG, F.; ZHENG, Z.; ZHONG, M.; LUN, J.; ZHANG, Y. A *Litopenaeus vannamei* Hemocyanin-Derived Antimicrobial Peptide (Peptide B11) Attenuates Cancer Cells' Proliferation. **Molecules**, v. 23, 2018.

MAGALHÃES, C.; BUENO, S. L. S.; BOND-BUCKUP, G.; VALENTI, W. C.; SILVA, H. L. M.; KIYOHARA, F.; MOSSOLIN, E. C.; ROCHA, S. S. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of São Paulo, Brazil: Records and possible causes of their introduction. **Biodiversity and Conservation**, n. 14, p. 1929-1945, 2005.

MAGNUS K. A.; HAZES, B.; TON-THAT, H.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; HOL, W. G. J. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences,

Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, v. 19, n. 4, p. 302-309, 1994.

MAKINO, N.; KIMURA, S. Subunits of *Panulirus japonicus* hemocyanin. 1. Isolation and properties. **European Journal Biochemical**, v. 173, p. 423-430, 1988.

MARKIDES K, GRÄSLUND A. Advanced information on the nobel prize in chemistry. **Royal Swedish Academy of Sciences**. p. 1-13, 2002.

MARKL, J.; DECKER, H. Molecular structure of the arthropod hemocyanins. In: **Blood and tissue oxygen carriers**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1992. p. 325-376.

MARKL, J.; SAVEL-NIEMANN, A.; WEGENER-STRAKE, A.; SUELING, M.; SCHNEIDER, A.; GEBAUER, W.; HARRIS, J. R. The role of two distinct subunit types in the architecture of keyhole limpet hemocyanin (KLH). **Naturwissenschaften**, v. 78, p. 512-514, 1991.

MARKL, Jürgen. Evolution of molluscan hemocyanin structures. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 9, p. 1840-1852, 2013.

MARTIN, A.G.; DEPOIX, F.; STOHR, M.; MEISSNER, U.; HAGNER-HOLLER, S.; HAMMOUTI, K.; BURMESTER, T.; HEYD, J.; WRIGGERS, W.; MARKL, J. Å Cryo-EM Structure, Sequence Analysis, Molecular Modelling and Rigid-body Fitting Reveal the Interfaces between the eight interfaces. **Journal of Molecular Biology**, v. 366, n. 4, p. 1332-1350, 2007.

MARTINEZ-ALVAREZ, O.; GOMEZ-GUILLEN, C.; MONTERO, P. Presence of hemocyanin with diphenoloxidase activity in deepwater pink-shrimp (*Parapenaeus longirostris*) post mortem. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1450-1460, 2008.

MARXEN, J. C.; PICK, C.; KWIATKOWSKI, M.; BURMESTER, T. Molecular characterization and evolution of haemocyanin from the two freshwater shrimps *Caridina multidentata* (Stimpson, 1860) and *Atyopsis moluccensis* (De Haan, 1849). **Journal Comp. Physiol. B**, v. 183, n. 5, p. 613-624, 2013.

MEISSNER, U.; STOHR, M.; KUSCHE, K.; BURMESTER, T.; STARK, H.; HARRIS, J. R.; ORLOVA, E.; MARKL, J. Quaternary structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*) 16-mer hemocyanin from cryoEM and amino acid sequence data. **J. Mol. Biol.**, v. 325, p. 99-109, 2003.

MICETIC, I.; LOSASSO, C.; DI MURO, P.; TOGNON, G.; BENEDETTI, P.; BELTRAMINI, M. Solution structures of 2 x 6-meric and 4 x 6-meric hemocyanins of crustaceans *Carcinus aestuarii*, *Squilla mantis* and *Upogebia pusilla*. **J Struct Biol** v.171, p.1–10, 2010.

MILLER, K. I.; CUFF, M. E.; LANG, W. F.; VARGA-WEISZ, P.; FIELD, K. G. VAN HOLDE, K. E. Sequence of the *Octopus dofleini* hemocyanin subunit: structural and evolutionary implications. **J. Mol. Biol.** v. 278, p. 827-842, 1998.

MILLER, K. I.; VAN HOLDE, K. E. The effect of environmental variables on the structure and function of hemocyanin *Callinassa californiensis* I. Oxygen binding. **Journal Comp. Physiol.** v. 143, p. 252-260, 1981.

MILLER, K. J.; ELDRED, N. W.; ARISAKA, F.; VAN HOLDE, K. E. Structure and function of hemocyanin from thalassinid shrimp. **Journal Comp. Physiol.** v. 115, p. 171-184, 1977.

MORIOKA, C.; TACHI, Y.; SUZUKI, S.; ITOH, S. Significant enhancement of monooxygenase activity of oxygen carrier protein hemocyanin by urea. **J. Am. Chem. Soc.** 128, 6788–6789, 2008.

MOUCHE, F.; ZHU, Y. X.; PULOKAS, J.; POTTER, C. S.; CARRAGHER, B. Automated three-dimensional reconstruction of keyhole limpet hemocyanin type 1. **J Struct Biol** 144:301–312, 2003.

MULLAIVANAM RAMASAMY, S.; DENIS, M.; SIVAKUMAR, S. Phenoloxidase activity in humoral plasma, hemocyanin and hemocyanin separated proteins of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 977-985, 2017.

MUNANSINGHE, D.H.N. Phylogenetic positions of some species of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in Sri Lanka. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v.38, n.3, p.193-199, 2010.

NAGAI, T.; KAWABATA, S. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29264-29267, 2000.

NAGAI, T.; OSAKI, T.; KAWABATA, S. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 27166-27170, 2001.

NILLIUS, D.; JAENICKE, E.; DECKER, H. Switch between tyrosinase and catecholoxidase activity of scorpion hemocyanin by allosteric effectors. **FEBS letters**, v. 582, n. 5, p. 749-754, 2008.

NOEL, P. Y.; MARTIN, M. Comparative study of hemocyanins of decapoda using isoelectric focusing. **Journal Crustacean Biology**, v. 15, p. 418-423, 1995.

ORLOVA, E. V.; DUBE, P.; HARRIS, J. R.; BECKMAN, E.; ZEMLIN, F.; MARKL, J.; VAN HEEL, M. Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. **Journal of molecular biology**, v. 271, n. 3, p. 417-437, 1997.

PAOLI, M.; GIOMINI, F.; HELLMANN, N.; JAENICKE, E.; DECKER, H.; DI MURO, P.; BELTRAMINI, M. The molecular heterogeneity of hemocyanin: Structural and functional properties of the 4 x 6-meric protein of *Upogebia pusilla* (Crustacea). **Gene**, v. 398, n. 1, p. 177-182, 2007.

PAUL, R. J.; PIROW, R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. **Zoology**, v. 100, n. 4, p. 298-306, 1998.

PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Taxonomic revision of some doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). **Iheringia, Série Zoologia**, v.102, n.4, p. 426-437, 2012.

PREAUX, G.; GIELENS, C. Hemocyanins. In: Lontie R, editor. **Copper proteins and copper enzymes**. Vol. 2. Boca Raton, FL: CRC Press; 1984. p. 159-205.

RASA, M.; LOHMEIJER, B. G. G.; HOFMEIER, H.; THIJS, H. M. L.; SCHUBERT, D.; SCHUBERT, U. S.; TZIATZIOS, C. Characterization of metallo-supramolecular block copolymers by analytical ultracentrifugation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 207, n. 22, p. 2029-2041, 2006.

RAYNOVA, Y.; DOUMANOVA, L.; IDAKIEVA, K. N. Phenoloxidase Activity of *Helix aspersa* Maxima (Garden Snail, Gastropod) Hemocyanin. **Journal Protein**, v. 32, p. 609-618, 2013.

REHM, P.; PICK, C.; BORNER, J.; MARKL, J.; BURMESTER, T. The diversity and evolution of chelicerate hemocyanin. **BMC evolutionary biology**, v. 12, n. 1, p. 19, 2012.

RICILUCA, K. C. T.; BORGES, A. C.; MELLO, J. F. R.; DE OLIVEIRA, U. C.; SERDAN, D. C.; FLOREZ-ARIZA, A.; CHAPARRO, E.; NISHIYAMA, M. Y.; CASSAGO, A.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; et al. Myriapod haemocyanin: The first three-dimensional reconstruction of Scolopendra subspinipes and preliminary structural analysis of S. Viridicornis. **Open biology**, v. 10, n. 4, p. 190258, 2020.

RIGGS, D. R.; JACKSON, B.; VONA-DAVIS, L.; MCFADDEN, D. In vitro anticancer effects of a novel immunostimulant: keyhole limpet hemocyanin. **Journal of Surgical Research**, v. 108, n. 2, p. 279-284, 2002.

RODRIGUES, V. D.; COMIN, C. H.; SOARES, J. C.; SOARES, A. C.; MELENDEZ, M. E.; FREGNANI, J. H.; CARVALHO, A. L.; COSTA, L. D.; OLIVEIRA JR, O.N. Analysis of Scanning Electron Microscopy Images To Investigate Adsorption Processes Responsible for Detection of Cancer Biomarkers. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 7, p. 5885-5890, 2017.

ROGALA, A.; GONDKO, R. Some physico-chemical properties of *Astacus* hemocyanin, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 603-606, 1981.

ROLFF, M.; SHOTTENHEIM, J.; DECKER, H.; TUCZEK, F. Copper–O 2 reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 4077-4098, 2011.

SABATUCCI, A.; ASCONE, I.; BUBACCO, L.; BELTRAMINI, M.; DI MURO, P.; SALVATO, B. Comparison of the X-ray absorption properties of the binuclear active site of molluscan and arthropodan hemocyanins. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 120-128, 2002.

SABBATINI, P. J.; RAGUPATHI, G.; HOOD, C.; AGHAJANIAN, C. A.; JURETZKA, M.; IASONOS, A.; HENSLEY, M. L.; SPASSOVA, M. K.; OUERFELLI, O.; SPRIGGS, D. R.; TEW, W. P.; KONNER, J.; CLAUSEN, H.; ABU RUSTUM, N.; DANSIHEFSKY, S. J.; LIVINGSTON, P. O. Pilot study of a

heptavalent vaccine-keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS21 in patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 14, p. 4170-4177, 2007.

SANDERS, N. K.; CHILDRESS, J. J. Specific effects of thiosulphate and L-lactate on hemocyanin-O₂ affinity in a brachyuran hydrothermal vent crab. **Marine Biology**, v. 113, p. 175-180, 1992.

SANDRA, K.; DOLASHKA-ANGELOVA, P.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J. New insights in *Rapana venosa* hemocyanin N-glycosylation resulting from on-line mass spectrometric analyses. **Glycobiology**, v. 17, n. 2, p. 141-156, 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.

SATOH, D.; HORII, A.; OCHIAI, M.; ASHIDA, M. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, characterization, and cDNA cloning. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7441-7453, 1999.

SCHUCK, P. Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 3, p. 1606-1619, 2000.

SCHÜTZ, J.; DOLASHKA-ANGELOVA, P.; ABRASHEV, R.; NICOLOV, P.; VOELTER, W. Isolation and spectroscopic characterization of the structural subunits of keyhole limpet hemocyanin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1546, n. 2, p. 325-336, 2001.

SELLOS, D.; LEMOINE, S.; VAN WORMHOUDT, A. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. **Febs Lett.**, v. 407, n.7, p.153-158, 1997.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L.; JOHANSSON, M. W. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. In: SÖDERHÄLL K, IWANAGA S, VASATA G. R, editors. **New directions in invertebrates immunology**. Fair Heaven, New Jersey: SOS Publications. p. 229-254, 1996.

SOHNGEN, M. S.; STAHALMANN, A.; HARRIS, J. R.; MULLER, S. A.; ENGEL, A.; MARKL, J. Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH). **Euro J Biochem**, v. 248, p. 602-614, 1997.

SOLOMON, E. I.; BALDWIN, M. J.; LOWERY, M. D. Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity, **Chem. Rev.**, v. 92, p. 521-542, 1992.

SOMBOONWIWAT, K.; CHAIKEERATISAK, V.; WANG, H.C.; FANG, L.C.; TASSANAKAJON, A. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection. **Proteome Sci.**, v.8, n.1, p.39-50, 2010.

SPARKMAN, O. D. Mass spectrometry desk reference 2. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, n. 11, p. 1144, 2000.

SPINOZZI, F.; GATTO, S.; DE FILIPPIS, V.; CARSUGHI, F.; DI MURO, P.; BELTRAMINI, M. Contribution of the copper ions in the dinuclear active site to the stability of *Carcinus aestuarii* hemocyanin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 439, n. 1, p. 42-52, 2005.

STAFFORD, W. F.; SCHUSTER, T. M. Hydrodynamic methods. **Introduction to biophysical methods for protein and nucleic acid research**, p. 111-145, 1995.

STERNER, R.; DECKER, H. Inversion of the Bohr effect upon oxygen binding to 24-meric tarantula hemocyanin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 11, p. 4835-4839, 1994.

STOEVA, S.; DOLASHKA, P.; GENOV, N.; VOELTER, W. Domain structure of the *Rapana thomasiana* (Gastropod) hemocyanin, **GIT Special "Prof. Bayer"**, p. 75-79, 1997a.

STOEVA, S.; DOLASHKA, P.; PERVANOVA, K.; GENOV, N.; VOELTER, W.; Multidomain structure of the *Rapana thomasiana* (Gastropod) hemocyanin structural subunit RHSS1. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 4, p. 927-934, 1997b.

STOEVA, S.; IDAKIEVA, K.; GEORGIEVA, D. N.; VOELTER, W.; GENOV, N. *Penaeus monodon* (tiger shrimp) hemocyanin: subunit composition and thermostability. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 56, n. 5-6, p. 416-422, 2001.

STOYANOVA, E.; MIHAYLOVA, N.; MANOYLOV, I. et al. Intensive therapy with gastropodan hemocyanins increases their antitumor properties in murine model of colon carcinoma. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 106566, 2020.

STREIT, K.; JACKSON, D.; DEGNAN, B. M.; LIEB, B. Developmental expression of two *Haliotis asinina* hemocyanin isoforms, **Differentiation**, v. 73, p. 341-349, 2005.

SUGUMARAN, M. Role of the insect cuticle in host defense reactions. In: Söderhäll K, Iwanaga S, Vasata GR, editors. New directions in invertebrates immunology. **Fair Heaven, New Jersey: SOS Publications**, p. 355-374, 1996.

SUMINOE, A.; MATSUZAKI, A.; HATTORI, H.; KOGA, Y.; HARA, T. Immunotherapy with autologous dendritic cells and tumor antigens for children with refractory malignant solid tumors. **Pediatric transplantation**, v. 13, n. 6, p. 746-753, 2009.

SUN, Z.; LIAO, T.; ZHANG, Y.; SHU, J.; ZHANG, H.; ZHANG, G. J. Biomimetic nanochannels based biosensor for ultrasensitive and label-free detection of nucleic acids. **Biosensors and Bioelectronics**, v.86, p.194-201, 2016.

SWERDLOW, R. D.; EBERT, R. F.; LEE, P.; BONAVENTURA, C.; MILLER, K. I. Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers, **Comp. Biochem. Physiol.** v. 113B, p. 537-548, 1996.

TAJIRI, M.; TAKEUCHI, T.; WADA, Y. Distinct features of matrix-assisted 6 μm infrared laser desorption/ionization mass spectrometry in biomolecular analysis. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 16, p. 6750-6755, 2009.

TAYLOR, A. C.; ASTALL, C. M.; ATKINSON, R. J. A. A comparative study of the oxygen transporting properties of the haemocyanin of five species of thalassinidean mud-shrimps. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 244, p. 265-283, 2000.

TAYLOR, K. D. A. Black spot development in crustaceans: Existing and potential methods of control. In Subiyanto, Watanabe E, editors. **Proceedings of the first seminar on the sea food science and technology in tropical area**; Semarang, Indonesia: Depongoro University. p. 221-236, 1995.

TODINOVA, S.; RAYNOVA, Y.; IDAKIEVA, K. Calorimetric study of *Helix aspersa* maxima hemocyanin. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, 2018.

TODOROVSKA, E.; IVANOV, M.; RADKOVA, M.; DOLASHKI, A.; DOLASHKA, P. Molecular Cloning, Structure and Phylogenetic Analysis of a Hemocyanin Subunit from the Black Sea Crustacean *Eriphia verrucosa* (Crustacea, Malacostraca). **Genes**, v. 12, n. 1, p. 93, 2021.

VAN HOLDE, K. E.; MILLER, K. I.; LANG, W. H. Molluscan hemocyanins: structure and function. **Adv. Compar. Environ. Physiol.** v. 13, p. 258-300, 1992.

VAN HOLDE, K. E.; MILLER, K. I. Hemocyanins. In: Anfinsen CB, Edsall JT, Eisenberg DS, Richards FM, editors. **Advances in Protein Chemistry**. New York, Academic Press Inc. v. 47, p. 1-81, 1995.

VAN-HOLDE, K. E.; MILLER, K. I.; DECKER, H. Hemocyanins and invertebrate evolution. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.19, p.15563-15566, 2001.

VARSHNEY, A.; AHMAD, B.; RABBANI, G.; KUMAR, V.; YADAV, S.; KHAN, R. H. Acid-induced unfolding of didecameric keyhole limpet hemocyanin: detection and characterizations of decameric and tetrameric intermediate states. **Amino Acids**, v. 39, n. 3, p. 899-910, 2010.

VELKOVA, L.; DIMITROV, I.; SCHWARZ, H.; STEVANOVIC, S.; VOELTER, W.; SALVATO, B. et al. Structure of hemocyanin from garden snail *Helix lucorum*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 157, p. 16-25, 2010.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular. 4. ed. **Porto Alegre: Artmed**, 2014.

VOGEL, V. K.; LANGER, K.; BALTHASAR, S. P.; SCHUCK, P.; MACHTLE, W.; HAASE, W.; VAN DEN BROEK, J. A.; TZIATZIOS, C.; SCHUBERT, D. Characterization of serum albumin nanoparticles by sedimentation velocity analysis and electron microscopy. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 119, p. 31-36, 2002.

VOLBEDA, A.; HOL, W. G. J. Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 209, n. 2, p. 249-279, 1989.

WANG, W.; XIA, X.; LIU, F.; CHEN, X.; YANG, H.; NING, Q. Cloning and characterization of the hemocyanin gene of prawn *Macrobrachium nipponense*. **Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi**, v.37, n.4, 2012.

WRIGHT, J.; CLARK, W. M.; CAIN, J. A.; PATTERSON, A.; COATES, C. J.; NAIRN, J. Effects of known phenoloxidase inhibitors on hemocyanin-derived phenoloxidase from *Limulus polyphemus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 163, n. 3-4, p. 303-308, 2012.

WU, K. J.; ODOM, R. W. Peer reviewed: characterizing synthetic polymers by MALDI MS. **Analytical chemistry**, v. 70, n. 13, p. 456A-461A, 1998.

YAN, F.; ZHANG, Y.; JIANG, R.; ZHONG, M.; HU, Z.; DU, H. et al. Identification and agglutination properties of hemocyanin from the mud crab (*Scylla serrata*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, p. 354-360, 2011.

YAN, X.; TAYLOR, K. D. A. Studies of the mechanism of phenolase activation in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). **Food chemistry**, v. 41, n. 1, p. 11-21, 1991.

YANG, P.; YOU, J.; LI, F.; FEI, J.; FENG, B.; HE, X.; ZHOU, J. Electrochemical biosensing platform based on a hemocyanin–Au@QC NP–carbon black hybrid nano-composite film. **Analytical Methods**, v. 5, n. 13, p. 3168-3171, 2013.

YEPIZ-PLASCENCIA, G. M.; SOTELO-MUNDO, R.; VAZQUEZ-MORENO, L.; ZIEGLER, R.; HIGUERA-CIAPARA, I. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* boone. Isolation and partial characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 111, n. 2, p. 181-187, 1995.

ZANJANI, N. T.; SAKSENA, M. M.; DEHGHANI, F.; CUNNINGHAM, A. L. From ocean to bedside: the therapeutic potential of molluscan hemocyanins. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 20, p. 2292-2303, 2018.

ZHANG, X.; HUANG, C.; QIN, Q. Anti-viral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. **Antiviral research**, v. 61, n. 2, p. 93-99, 2004.

ZHANG, Y.; YAN, F.; HU, Z.; ZHAO, X.; MIN, S.; DU, Z.; ZHAO, S.; YE, X.; LI, Y. Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity. **Fish Shellfish Immunol**, v. 27, p. 330–335, 2009.

ZHUANG, J.; COATES, C. J.; ZHU, H.; ZHU, P.; WU, Z.; XIE, L. Identification of candidate antimicrobial peptides derived from abalone hemocyanin. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 49, n. 1, p. 96-102, 2015.

ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

1. Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

OLIVEIRA, J.B.S.; RAMOS, L.; SOUZA, C.O.; SEBASTIÃO, I.; CARUSO, C.; CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; MORGANTE, P. G.; SANTIAGO, P.S. Biophysical characterization of *Amyntas gracilis* giant extracellular hemoglobin (HbAg). **European Biophysics Journal**, v. 49, p. 473-484, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01455-8>

2. Trabalhos publicados em eventos científicos:

SEBASTIÃO, I; SOUZA, C. O.; RAMOS, L.; MORGANTE, P. G.; SANTIAGO, P. S. Interaction of the monomer d of the extracellular hemoglobin of *Aminthas gracilis* (HbAg) with the anionic surfactante sodium dodecyl sulfate (SDS). **XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica**, Santos-SP, 2019.

SOUZA, O. S.; RAMOS, L.; SEBASTIÃO, I.; DE MARAES, M. L.; SANTIAGO, P. S. Use of hemoglobins for metal biosensing. **XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica**, Santos-SP, 2019.

RAMOS, L.; FARIA, G. H. A.; SOUZA, C.O., OLIVEIRA, J.B.S.; SANTIAGO, P.S. Extraction, purification and initial characterization of a new freshwater shrimp hemocyanin of *Macrobrachium acanthurus* (HcMac). **Annual Meeting of SBBQ**, Joinville-SC, 2018.

SOUZA, C.O.; RAMOS, R.A.; RAMOS, L.; OLIVEIRA, J.B.S; MORAES, M.L; SANTIAGO, P.S. Immobilization of hemoglobin from *Amyntas gracilis* (HbAg) using the layer-by-layer technique (LBL). **Annual Meeting of SBBQ**, Joinville-SC, 2018.

3. Bancas:

SANTIAGO, P. S.; BERTINI, G.; RAMOS, L. Participação em banca de Raíssa de Araújo Ramos. Imobilização da hemoglobina de *Amyntas gracilis* (HbAg) em polietilenoimina (PEI) visando a elaboração de biossensores de contaminação ambiental. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

4. Outros:

Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais. Cargo: Professor de Educação Básica (PEB) de Biologia/Ciências. Instituição: Escola Estadual Iracema Rodrigues, Machado – MG, 16/02/2022 à atual.

Professor Facilitador EAD, disciplinas: História da Educação, Filosofia da Educação e TCC – Curso Pedagogia. Universidade Virtual do Estado de São Paulo – UNIVESP, início em novembro de 2020 a 05/04/2022.

Supervisão de aluno de Iniciação Científica com bolsa PIBIC: Karyna Satomi Izume, aluna do curso de Engenharia de Pesca, 10/08/2019 a 14/04/2020.

Professor de Ensino Superior. Instituição: UNISEPE – União das Instituições de Serviço, Ensino e Pesquisa LTDA, 08/2019 a 01/2020.

Professor Facilitador EAD, disciplinas de Física II e Química. Universidade Virtual do Estado de São Paulo – UNIVESP, no período de 27/02/2019 a 27/07/2019.

Professor de Química no curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus Experimental Registro - SP. Pelo Programa de Aperfeiçoamento e Apoio à Docência no Ensino Superior (PAADES), 1º semestre de 2019.

Curso de extensão “ Mediação Pedagógica na Educação a Distância”, pela Universidade Virtual do Estado de São Paulo (UNIVESP), com carga horária de 40 horas, tendo sido realizado no período de 27/02/2019 a 30/05/2019.

Oficina de Formação Pedagógica - PAADES, realizada no Campus de Bauru-UNESP, no período de 10/12/2018 a 12/12/2018, com carga horária de 22 horas.

Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais. Cargo: Professor de Educação Básica (PEB) de Biologia, Ciências e Física. Instituição: Escola Estadual Gabriel Odorico, Machado – MG, 15/02/2018 a 31/12/2018.