

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO VALE DO RIBEIRA

**USO DA HEMOGLOBINA DE *Amyntas gracilis* COMO POTENCIAL BIOSSENSOR
DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL**

TRABALHO ORIGINAL DE PESQUISA

GUILHERME THEOBALDINO MAGALHÃES

Trabalho de Graduação apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do
Ribeira – UNESP para graduação em
ENGENHARIA AGRONÔMICA.

REGISTRO

2º Semestre/2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO VALE DO RIBEIRA

**USO DA HEMOGLOBINA DE *Amyntas gracilis* COMO POTENCIAL BIOSSENSOR
DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL**

TRABALHO ORIGINAL DE PESQUISA

GUILHERME THEOBALDINO MAGALHÃES

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Soares Santiago

Trabalho de Graduação apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do
Ribeira – UNESP para graduação em
ENGENHARIA AGRÔNOMICA.

REGISTRO

2º Semestre/2024

M188u	Magalhães, Guilherme Theobaldino USO DA HEMOGLOBINA DE <i>Amyntas gracilis</i> COMO POTENCIAL BIOSENSOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL / Guilherme Theobaldino Magalhães. -- Registro, 2024 33 p. : il., tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira, Registro Orientadora: Patrícia Soares Santiago 1. Biomoléculas. 2. Biofísica. 3. Hemoglobina. 4. Annelida. I. Título.
-------	--

CERTIFICADO

TRABALHO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA AGRÔNOMICA

TÍTULO: "USO DA HEMOGLOBINA DE *Amyntas gracilis* COMO POTENCIAL
BIOSSENSOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL"

ACADÊMICO: Guilherme Theobaldino Magalhães

ORIENTADOR(A): Profª Assoc. Patrícia Soares Santiago

PERÍODO: 9º Semestre 5º Ano

Aprovado: ☒

Reprovado: ☐

BANCA EXAMINADORA:

Presidente Profª Assoc. Patrícia Soares Santiago

Membro Profª Dra. Ana Letícia Madeira Sanches

Membro Profª Dra. Francisca Alcivânia de Melo Silva

Registro, 11 / 12 / 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para esse trabalho. Em especial agradeço à minha orientadora Prof^ª. Patrícia Soares Santiago e ao Prof. Claudemir Oliveira Souza pela paciência, apoio e por todos os conhecimentos compartilhados ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os voluntários no processo de extração de proteína e ao grupo de pesquisas em biomoléculas por todo o apoio e tempo dedicado. Em especial ao Rodolfo Osin de Moraes pelo auxílio durante todo o período de desenvolvimento.

A todos os professores que durante minha jornada acadêmica contribuíram com a base para que tudo fosse possível, e aos meus amigos e família pelo apoio.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto, ao Instituto de Estudos Avançados do Mar e a Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira (FCAVR) por tornar possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A contaminação ambiental por metais pesados provenientes de atividades agrícolas, industriais e mineradoras compromete o equilíbrio ecológico. Esses contaminantes podem ser absorvidos por anelídeos, como *Amyntas gracilis*, amplamente distribuída no Brasil e conhecida por sua resiliência a solos contaminados. Essa adaptação está associada a propriedades específicas de sua hemoproteína (HbAg), que possui características bioquímicas e biofísicas promissoras para uso em biossensores ambientais. Este trabalho avaliou a interação da HbAg com cobre usando técnicas biofísicas, como absorção ótica, fluorescência, espalhamento de luz e DLS, para fundamentar o desenvolvimento de biossensores ópticos. Após extração e purificação da HbAg, foi possível obter uma concentração de 20 mg.mL⁻¹. Análises realizadas em pH 7,0 e 9,0 mostraram deslocamento da banda de Soret, aumento da fluorescência e maior tamanho molecular conforme crescia a concentração de cobre. Esses efeitos foram mais evidentes em pH 9,0, com concentrações acima de 5 µmol.L⁻¹, enquanto em pH 7,0 ocorreram acima de 30 µmol.L⁻¹. Os resultados indicam maior estabilidade da HbAg em pH neutro e alta sensibilidade ao cobre, confirmando seu potencial como matéria-prima para biossensores. No entanto, estudos futuros devem buscar maior seletividade, já que a HbAg pode se oxidar na presença de outros agentes.

Palavras-chave: biossensores; minhoca; DLS; biomarcador; anelídeos

ABSTRACT

Environmental contamination by heavy metals from agricultural, industrial, and mining activities threatens ecological balance. These contaminants can be absorbed by annelids, such as *Amyntas gracilis*, widely distributed in Brazil and known for its resilience to contaminated soils. This adaptation is linked to specific properties of its hemoprotein (HbAg), which exhibits promising biochemical and biophysical characteristics for use in environmental biosensors. This study evaluated the interaction of HbAg with copper using biophysical techniques such as optical absorption, fluorescence, light scattering, and DLS to support the development of optical biosensors. After extracting and purifying HbAg, a concentration of 20 mg.mL⁻¹ was achieved. Analyses conducted at pH 7,0 and 9,0 revealed a shift in the Soret band, increased fluorescence, and larger molecular size as copper concentration increased. These effects were more pronounced at pH 9,0 with concentrations above 5 µmol.L⁻¹, while at pH 7,0, they occurred above 30 µmol.L⁻¹. The results indicate greater stability of HbAg at neutral pH and high sensitivity to copper, confirming its potential as a raw material for biosensors. However, future studies should aim for greater selectivity, as HbAg may also oxidize in the presence of other chaotropic agents.

Keywords: biosensors; earthworm; DLS; biomarker; annelids

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 Contaminação de solos por metais pesados.....	9
2.2 Biossensores.....	10
2.3 Aplicações biotecnológicas dos anelídeos e suas hemoglobinas.....	11
3. OBJETIVO GERAL.....	12
3.1 Objetivos específicos.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Extração.....	13
4.2 Purificação.....	13
4.3 Ensaio.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5.1 Interação da HbAg com diferentes concentrações de cobre no pH 7,0.....	15
5.2 Interação da HbAg com diferentes concentrações de cobre no pH 9,0.....	22
6. CONCLUSÃO.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

Os anelídeos são animais invertebrados segmentados com um corpo alongado e dividido em anéis (ou segmentos), que se encontram amplamente distribuídos pelo mundo, vivendo tanto em ambientes aquáticos, quanto em ambientes terrestres e apresentando ampla variedade de tamanhos e formas (Rouse e Pleijel, 2007). Existem várias divisões de anelídeos, estabelecidas principalmente com base em fatores filogenéticos, dentre elas os mais conhecidos popularmente são os Oligoquetos, tais como as minhocas e os hirudíneos.

As minhocas são animais que vêm despertando cada vez mais o interesse do meio acadêmico, visto que apresentam a capacidade de sobreviver em ambientes adversos, contendo altas concentrações de elementos tóxicos tais como metais pesados e agrotóxicos (Amaral *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2011). Dito isso, algumas espécies de minhocas (*Eisenia andrei*, *Eisenia fétida*, *Lumbricus terrestris* e *Amyntas gracilis*) têm sido utilizadas em estudos de ecotoxicológicos, devido ao potencial como bioindicador de contaminação do solo (Cristina *et al.*, 2022; Bartz *et al.*, 2024).

É comum entre os anelídeos a presença de alta tolerância a ambientes contaminados por hidrocarbonetos e metais pesados, existindo evidências consideráveis de que tal adaptabilidade é decorrente de um conjunto de características morfológicas, anatômicas e fisiológicas dentre elas a estabilidade de suas hemoproteínas (Rousselot *et al.*, 2006; Dawood *et al.*, 2017; Calisi *et al.*, 2011).

As hemoglobinas extracelulares gigantes são moléculas carreadoras de oxigênio presente em anelídeos e moluscos (Nascimento *et al.*, 2022), também conhecidas como eritrucruorinas. Tais moléculas apresentam alta estabilidade oligomérica, alta resistência a oxidação e auto-oxidação, alta afinidade e cooperativismo com oxigênio, além de alto peso molecular na ordem de 3,6 MDa (Carvalho *et al.*, 2011, 2012, 2015). Vale salientar que o peso molecular da hemoglobina humana é 64 kDa possuindo 4 grupos heme enquanto as hemoglobinas dos anelídeos possuem cerca de 144 grupos heme e, portanto, consideravelmente menos estável e eficiente que as hemoglobinas de minhocas (Alayash *et al.*, 1999; Ferenz e Steinbicker, 2019).

A estrutura da HbAg é composta por 4 cadeias monoméricas distintas (*a*, *b*, *c* e *d*), composta cada uma delas por um grupo heme, e três cadeias *linkers* também distintas (*L1*, *L2* e *L3*), apresentando uma estrutura composta por $12(abcd)_3L_3$. Assim, esta estrutura bastante complexa é composta por uma bicamada hexagonal formada de várias subunidades monoméricas (cadeias que possuem grupo heme) e outras que não possuem grupo heme, *linkers*. Cada camada em uma rotação de 16° em relação a outra, proporcionando um

ambiente de diversas cadeias polipeptídicas protegidas contendo grupamentos Heme, o que garante a sua alta estabilidade oligomérica e resistência a oxidação e proporciona melhores condições para o seu armazenamento e manipulação (Oliveira *et al.*, 2020).

Com base nestas propriedades, muitos estudos usando as hemoglobinas de anelídeos como um modelo de sangue artificial e como uma biomolécula biomarcadora tem sido desenvolvidos (Calisi *et al.*, 2019; Cristina *et al.*, 2022; Ferenz e Steinbicker, 2019; Timm e Elmer, 2022; Wang *et al.*, 2020). Na região do Vale do Ribeira, SP, uma das espécies de anelídeos presente é a *Amyntas gracilis*. A *A. gracilis* é uma espécie exótica de origem asiática pertencente à família *Megascolecidae*, popularmente conhecida como “minhoca saltadora” ou “minhoca louca”, distribuída principalmente em solos úmidos com abundância de matéria orgânica (Falco e Coviella, 2016). Visto a sua ampla disponibilidade e a escassez de estudos sobre tal espécie, quando comparado com outros animais de mesmo filo, é de importância que sua hemoproteína seja mais explorada e investigada (Souza, 2018). Essa lacuna de conhecimento representa uma oportunidade estratégica para inovação biotecnológica sustentável.

No contexto ambiental, a contaminação por metais pesados representa uma ameaça global, pois a poluição é algo que está intrinsecamente atrelado a atividades antrópicas de larga escala, dentre elas a mineração, indústria e agricultura, prejudicando o ecossistema e exigindo ferramentas eficazes, rápidas e de baixo custo para monitoramento (Jiang *et al.*, 2020). Tais fatores em conjunto da facilidade de coleta e a ampla disponibilidade da *A. gracilis* nos solos brasileiros, reforçam sua viabilidade para estudos científicos e aplicações práticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminação de solos por metais pesados

Um dos maiores problemas globais em relação à produção de alimentos e da indústria em geral é a poluição ambiental, dando destaque principalmente aos metais pesados tais como cádmio, cobre e mercúrio que são elementos tóxicos e bioacumulativos. Tais metais quando depositados no solo ou em cursos d'água liberam íons que interagem com o meio e com os seres vivos nele presentes, potencialmente apresentando efeitos nocivos em todo o ecossistema (Moraes *et al.*, 2009).

Os metais pesados são elementos da classe dos metais ou metaloides que apresentam densidade superior a 5 g.cm⁻³, assim como Ni, Cd, Zn, Hg, As e Cu. Tais elementos são resíduos comumente gerados por meio de atividades antrópicas, sendo as mais expressivas a

mineração, atividades industriais e práticas agrícolas (Jiang *et al.*, 2020). Como apontado por Ahmad *et al.* (2021) tais resíduos podem alcançar os recursos hídricos como águas superficiais ou até mesmo subterrâneas, contaminando a fauna e flora aquática, e além disso podem ser biomagnificados ao longo da cadeia trófica. Não se limitando apenas a recursos hídricos, rejeitos sólidos contendo metais pesados podem contaminar o solo de áreas próximas de sua deposição, existindo indícios que na forma de poeira pode atingir áreas urbanas, principalmente nas proximidades de bacias de rejeitos de mineração, como observado por SANTOS *et al.* (2020) podendo se tornar um risco à saúde pública.

Os riscos relacionados aos metais pesados estão relacionados com a sua capacidade de se ligar a proteínas, enzimas e outras biomoléculas, alterando as suas propriedades físicas e químicas, tanto de espécies animais como vegetais (Xiang *et al.*, 2021). Em plantas, tais alterações tendem a levar à alterações genéticas, desregulação hormonal, inativação de enzimas e proteínas, além de também prejudicar a diversidade e o crescimento das populações microbianas do solo (Rashid *et al.*, 2023). No corpo humano, tais efeitos variam amplamente entre os metais pesados e em que estado de oxidação eles se encontram. Todavia, é comum a carcinogênese, teratogênese, defeitos ósseos e danos nos sistemas cardiovascular, digestório, nervoso e respiratório (Ahmad *et al.*, 2021).

Existem diversos métodos e técnicas desenvolvidos pelos quais é possível a detecção e quantificação de metais pesados, entre elas, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de absorção atômica, “Surface Enhanced Raman Spectroscopy” (SERS) e tecnologia de impressão iônica. Tais técnicas, apesar de serem eficientes e precisas, necessitam de equipamentos específicos de alto custo e profissionais altamente qualificados (Chen *et al.*, 2023). Uma das formas mais simples e baratas de se detectar e quantificar metais pesados é por espectrometria no UV-visível, embora exista alta interferência na presença de mais de um elemento, sendo necessário se conhecer previamente o metal a ser analisado (Xu *et al.*, 2022). Outro método que vem sendo utilizado é a utilização de biossensores, instrumentos analíticos que podem apresentar reprodutibilidade, linearidade, sensibilidade, seletividade, estabilidade e custo reduzido (Velusamy *et al.*, 2022).

2.2 Biossensores

Os biossensores são instrumentos analíticos capazes de traduzir determinados estímulos realizados por um componente biológico em sinais elétricos. O seu funcionamento depende intrinsecamente de quatro elementos: um analito, que é a substância a ser analisada ou identificada; um bioreceptor, que consta de uma molécula, enzima ou qualquer elemento

biológico capaz de interagir com o analito; um transdutor, componente capaz de traduzir a interação do analito com o bioreceptor na forma de sinais elétricos; e por fim são necessários componentes eletrônicos capazes de processar os dados coletados (Naresh e Lee, 2021).

Essencialmente, existem quatro tipos de biossensores, classificados de acordo com o tipo de interação analito-bioreceptor e o tipo de sinal gerado, podendo ser, mecânicos, elétricos, químicos e ópticos, sendo possível a combinação de tecnologias gerando uma grande variedade na estrutura dos biossensores. Os biossensores ópticos se baseiam na interação luminosa entre o analito e o bioreceptor, podendo essa ser por meio de raios X, ultravioleta, infravermelho, luz visível ou raios gamma. Tal método tem por característica a sua seletividade, rapidez, especificidade e sensibilidade, sendo frequentemente utilizados para análises ambientais, controle de processos de alimentos, análises de descoberta de medicamentos e pesquisas biomédicas, além de serem capazes de analisar proteínas (Chadha *et al.*, 2022).

2.3 Aplicações biotecnológicas dos anelídeos e suas hemoglobinas

O estudo das hemoglobinas de anelídeos já é algo recorrente na literatura, principalmente quando diz respeito à busca de sua aplicação como forma de desenvolver ferramentas biotecnológicas com diversas finalidades na área de agrária e ambiental. Pelo fato de sua estrutura ser altamente estável e apresentar alta afinidade com oxigênio, a sua aplicação como substituto sanguíneo vem sendo proposta em estudos como o de Timm e Elmer (2022) e Ferenz e Steinbicker (2019).

Além de estudos na área da saúde, as pesquisas de caráter ambiental e na área de agrárias também apresentam grande importância. Os anelídeos, por serem animais adaptados a condições adversas, possuem a capacidade de acumular substâncias nocivas em quantidades significativas. Essa habilidade está diretamente relacionada aos seus mecanismos de detoxificação, que podem ser usados como indicadores de contaminação ambiental. Um dos principais indicadores é o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como redutases (GR), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S transferase (GST). Além disso, há evidências de que esses organismos regulam proteínas, glicogênio e expressão gênica para proteger seus sistemas vitais contra os efeitos tóxicos de substâncias acumuladas (Wang *et al.*, 2020). Tal característica vem sendo estudada a fim de se propor soluções e estratégias contra a contaminação ambiental, como é o caso do estudo de Ekperusi e Aigbodion (2015), que tem apontado a utilização de minhocas como método de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. Os estudos de Yuvaraj *et al.* (2018) e Sun *et al.* (2020) apontam a utilização de vermicompostagem como meio plausível

de se tratar resíduos ricos em metais pesados da indústria de papel e da produção de biogás, respectivamente, tomando por vantagem a capacidade dos anelídeos de acumular metais pesados em seus tecidos. Nestes estudos os autores conseguiram constatar a redução significativa da concentração de metais pesados nos rejeitos que receberam os animais.

Os anelídeos têm sido amplamente estudados em toxicologia, especialmente pela sensibilidade e potencial como biomarcadores de contaminação ambiental. Wang *et al.* (2018) demonstraram em seus estudos a existência de acúmulo de cobre em tecidos de anelídeos expostos a solos contaminados por fungicidas cúpricos. Nos estudos de Calisi *et al.* (2011, 2019) espécies como *Eisenia fetida* e *Lumbricus terrestris*, aclimatadas em solos com metais pesados, apresentaram alterações no peso molecular de suas hemoglobinas, o acúmulo de metais em seus tecidos, bem como a diminuição na sua taxa de reprodução e a presença do comportamento de fuga. Esses resultados reforçam o uso dos anelídeos como biomarcadores de poluição do solo, contribuindo para análises mais precisas da biodisponibilidade de metais pesados e seus impactos adversos, além de possibilitar o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de remediação ambiental (Calisi *et al.*, 2011, 2013). Além disso, Souza (2018) evidenciou que a hemoglobina de *Amyntas gracilis* (HbAg) apresenta alterações estruturais e eletroquímicas quando exposta ao cobre, reforçando seu potencial como biomolécula indicadora de contaminação.

Com base nos estudos realizados por Calisi *et al.* (2011, 2019) e Carvalho *et al.* (2012, 2013, 2015) é possível constatar que as hemoproteínas de anelídeos, quando oxidadas, sofrem alterações em sua estrutura molecular que se refletem em alterações em suas propriedades, e que podem ser observadas por meio de técnicas óticas, como espectroscopia, fluorescência, espalhamento de luz e DLS, sendo compatíveis com a tecnologia de biossensores óticos. De acordo com a ampla disponibilidade e dispersão da *A. gracilis*, a compatibilidade da hemoglobina de anelídeos com a tecnologia de biossensores óticos, e o potencial dos dados obtidos resultarem em um biossensor preciso, rápido e de baixo custo, o presente trabalho visa o estudo da HbAg como biossensor ótico de contaminação por metais pesados. Estudo este realizado através de estudos biofísicos das interações entre HbAg e diferentes concentrações de sulfato de cobre nos valores de pH 7,0 e 9,0 através das técnicas de absorção ótica, fluorescência, espalhamento de luz e espalhamento de luz dinâmico (DLS).

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade da HbAg como um biossensor ótico na detecção de metais pesados, com enfoque na detecção de cobre.

3.1 Objetivos específicos

- a) Extração e purificação da hemoglobina extracelular de *A. gracilis* (HbAg).
- b) Averiguar HbAg como potencial componente bioreceptor para o desenvolvimento de um biossensor de contaminação por cobre.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extração

Para garantir a pureza os animais foram obtidos por meio de encomenda na empresa especializada em minhocultura Minhobox, sediada no município Juiz de Fora/MG. Para a extração da hemolinfa, cerca de 60 animais foram inicialmente anestesiados com água fria e gelo. Em seguida, foram fixados em uma placa de ágar para execução de um corte no dorso do animal (Figura 1). A fim de evitar a coagulação foram adicionadas gotas de solução de citrato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), e com o auxílio de pipetas Pasteur extraiu-se a hemolinfa (Souza, 2018).

Figura 1: Fixação e corte dorsal realizado em *A. gracilis*.



4.2 Purificação

A solução de hemolinfa com citrato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foi centrifugada em uma centrífuga Hitachi CT15RE a 12000 rpm por 15 minutos para a sedimentação de tecidos e demais impurezas. O sobrenadante (hemolinfa) foi então submetido a uma diálise de 12 horas com tampão tris-HCl na concentração 100 mmol.L^{-1} equilibrado em pH 7,0, utilizando-se uma membrana de 10 kDa para a remoção do citrato e demais moléculas menores (Souza, 2018).

A hemolinfa obtida na diálise foi submetida a uma ultracentrifugação em uma centrífuga Himac CS150NX a 54000 rpm por 6 horas a uma temperatura de 4°C , fazendo com

que a proteína sedimentasse. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a hemoproteína sedimentada foi ressuspensa com tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0. Em seguida, a proteína foi purificada em uma coluna de cromatografia líquida de exclusão de tamanho ‘Superdex 200’ de 60 cm de comprimento sob 20 Pa de pressão (Souza, 2018).

A determinação da concentração da proteína obtida foi determinada por meio da lei de Lambert-Beer utilizando-se um espectrofotômetro de UV-visível Shimadzu 1800, considerando-se o coeficiente de absorvidade molar em 415 nm de $5,1 \pm 0,6 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Souza, 2018). As amostras que se apresentaram muito diluídas foram concentradas por meio de centrifugação utilizando-se um tubo concentrador.

4.3 Ensaio

Os ensaios realizados consistiram na adição de CuSO₄ em doses crescentes entre 0 e 100 µmol.L⁻¹ à solução de proteína purificada a uma concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ com exceção para as amostras para leitura em DLS que constou em uma concentração de 0,3 mg.mL⁻¹, pois como a coleta de dados realizada pelo equipamento ocorre próxima às faces da cubeta, concentrações baixas geram maior erro. O tampão utilizado no preparo das amostras foi acetato-borato-fosfato 30 mmol.L⁻¹ em valor de pH nativo da proteína (pH 7), e valor de pH 9, monitorando as análises por até 24 horas para DLS e equilíbrio de 3 horas para as medidas espectroscópicas e de fluorescência. As análises espectrofotométricas foram realizadas à 25°C, em um espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1800 na faixa de 250 e 700 nm, os espectros de fluorescência e intensidade de espalhamento de luz (LSI) foram realizadas no espectrofluorímetro Shimadzu RF-6000 excitando as amostras em 295 nm, fazendo a varredura de fluorescência de 305 a 450 nm, e para as análises de LSI as amostras foram excitadas e emitidas no mesmo comprimento de onda (350 nm) (Souza, 2018).

Para as leituras de DLS o tampão foi filtrado três vezes utilizando-se filtros de seringa de nylon com malha de 0,45 µm e tanto os estoques de solução de CuSO₄ quanto às amostras preparadas (HbAg + CuSO₄) foram filtradas novamente antes de se iniciarem as leituras, para se evitar qualquer tipo de partículas, consideradas “Dust” ou poeira (Souza, 2018). Tais leituras foram realizadas em diferentes tempos (momentos), em um período de 24 horas de cada ensaio no equipamento Malvern Zetasizer PRO. Os procedimentos desde a extração até os ensaios foram realizados no Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar/UNESP) e no laboratório de Biomoléculas, ambos localizados na Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira (FCAVR/UNESP) na cidade de Registro/SP.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Interação da HbAg com diferentes concentrações de cobre no pH 7,0

A banda de Soret é um pico de absorção intenso na faixa azul do espectro visível, geralmente em torno de 400 nm, observado em compostos porfirínicos, como as hemoglobinas. Especificamente, a hemoglobina de anelídeos (HbAg) em sua forma nativa apresenta esse pico centrado em aproximadamente 415 nm. Essa absorção é atribuída a transições eletrônicas $\pi-\pi^*$ nos anéis porfirínicos. Tais proteínas também apresentam duas bandas características chamadas bandas Q. Estas são bandas de menor intensidade em comparação à banda de Soret, sendo observadas na região do espectro visível com picos de absorbância nos comprimentos de onda aproximados de 540 nm e 575 nm, como descrito por Santiago *et al.* (2010). A adição de cobre à HbAg ocasiona um deslocamento do pico da banda de Soret, bem como a redução da absorbância das bandas Q, fenômeno este mais evidente nas concentrações de 80 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CuSO_4 como observado na Figura 2. Através de uma análise mais detalhada dos dados obtidos na espectrofotometria foi possível a confirmação do deslocamento do comprimento de onda (do ponto máximo da banda de Soret para menores comprimentos de onda), juntamente da diminuição da sua intensidade de absorbância ilustrada na Figura 3. Onde pode-se assumir que a concentração crítica para o seu deslocamento se encontra em cerca de 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CuSO_4 . Adicionalmente, foi observado um aumento na intensidade de absorbância nas concentrações mais elevadas de CuSO_4 , especialmente em comprimentos de onda iguais ou inferiores a 350 nm. Esse fenômeno sugere um aumento no espalhamento de luz, o que foi posteriormente confirmado pelas leituras de LSI (intensidade de espalhamento de luz) na faixa de 350 nm, conforme apresentado na Figura 4. O aumento na absorbância nas regiões próximas a 500 e 620 nm é uma característica típica de proteínas oxidadas, indicando a possível formação de espécies agregadas/oxidadas (Souza, 2018).

Figura 2: Espectros de absorção ótica de amostras de HbAg $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ na presença de diferentes concentrações de CuSO_4 no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , pH 7,0.

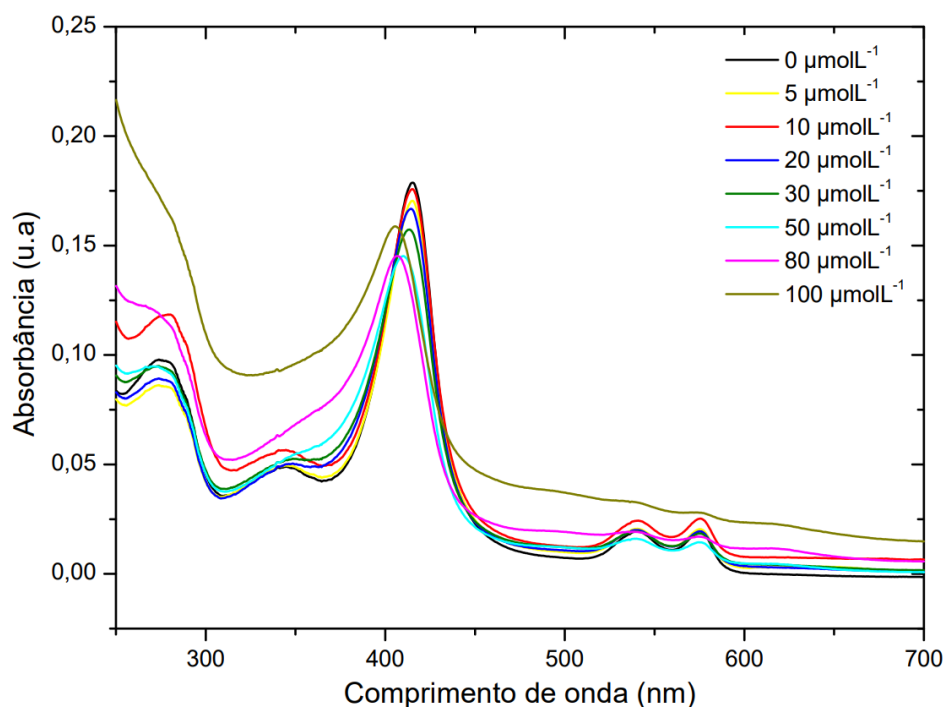


Figura 3: Intensidade de absorção monitorada em 415 nm e comprimento de onda máximo (λ_{max}) da banda de Soret da HbAg submetidas a concentrações crescentes de CuSO_4 no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , pH 7,0.

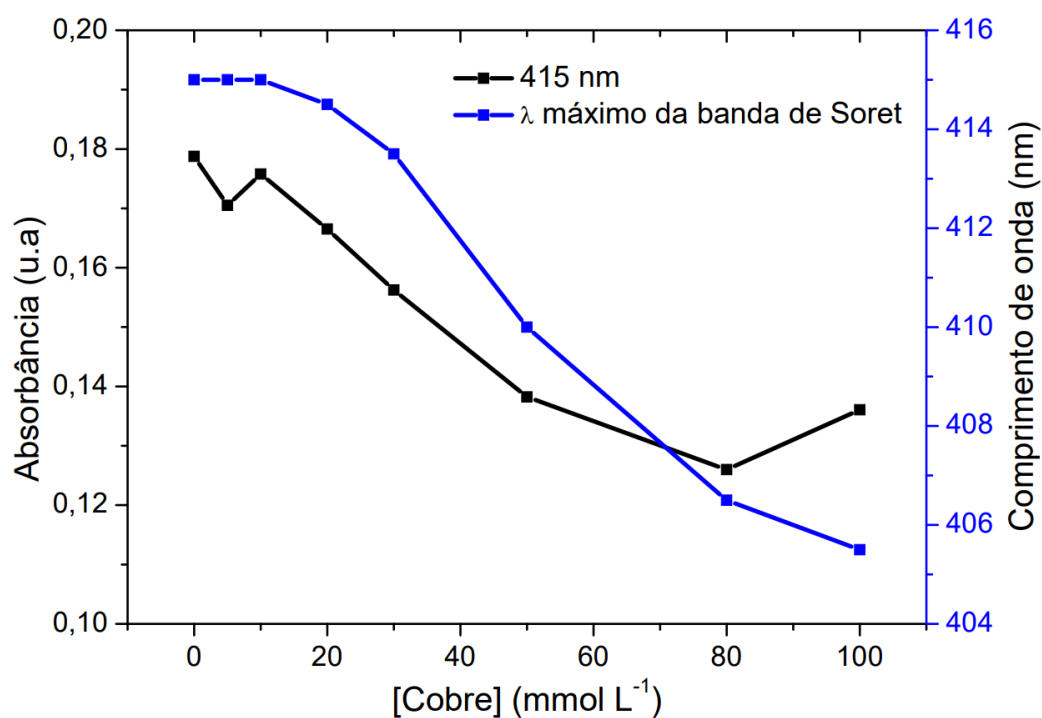
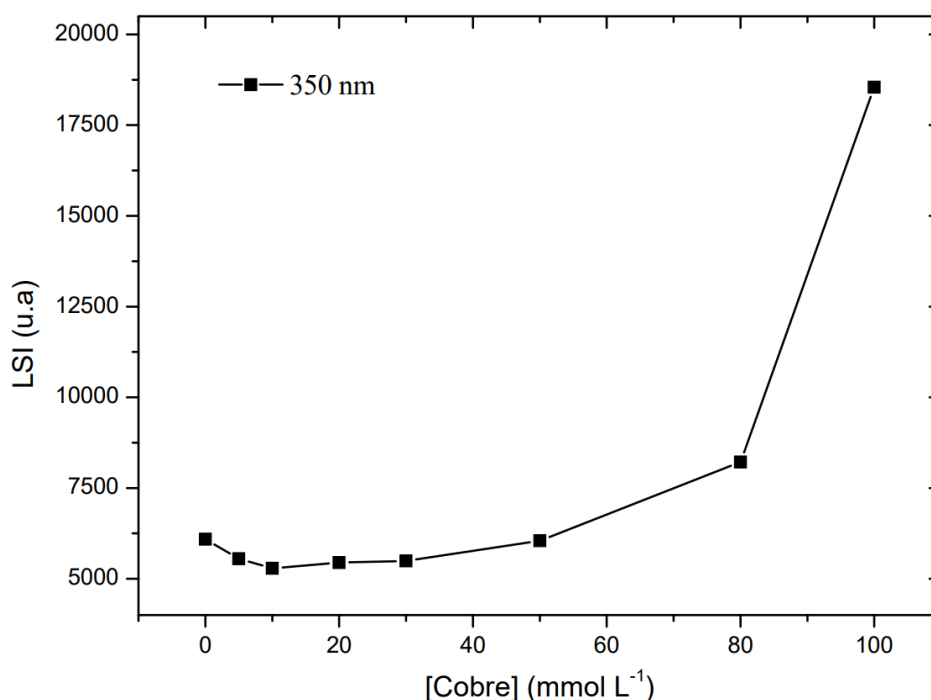


Figura 4: Intensidade de espalhamento de luz em 350 nm da HbAg 0,1 mg.mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L⁻¹, pH 7,0, em função da concentração de CuSO₄



Os estudos de Ramos (2017) sobre a interação da HbAg com surfactantes indicam que, em pH 7,0, a predominância de cargas negativas na proteína (ponto isoelétrico na faixa de pH 5,4) favorece a formação de agregados com substâncias catiônicas, como os íons de cobre presentes na solução. Esses agregados estão associados ao aumento da intensidade do espalhamento de luz na faixa de 250 a 700 nm, ao deslocamento do ponto máximo da banda de Soret de 415 nm para comprimentos de onda menores, e à redução da intensidade das bandas Q, fenômenos também observados nos resultados obtidos neste estudo.

Ao observar-se a Figura 5 é possível se constatar que houve alterações na intensidade de fluorescência da proteína, caracterizado inicialmente pela diminuição da intensidade de fluorescência seguida pelo aumento da intensidade de fluorescência em função da concentração de cobre. A Figura 6 apresenta os fatores da área destes espectros normalizados pela área do espectro de fluorescência na ausência de cobre, onde é possível observar a diminuição seguida pelo aumento da intensidade de fluorescência. Tal fenômeno está possivelmente relacionado com a oxidação e subsequente dissociação da proteína, pois no interior de sua estrutura, protegidos pela sua conformação em bicamada estão presentes aminoácidos de cadeias aromáticas que apresentam fluorescência, principalmente o triptofano que pode ser exposto em consequência da dissociação da proteína, aumentando a intensidade de fluorescência (Carvalho *et al.*, 2012).

Os resultados de fluorescência obtidos são consistentes com os reportados por Ramos (2017), que investigou o efeito do surfactante catiônico cloreto de cetiltrimetilamônio na HbAg. Nesse estudo, foi observado um aumento da intensidade de fluorescência associado à desnaturação e dissociação oligomérica da HbAg, levando à liberação de resíduos de triptofano previamente protegidos no ambiente hidrofóbico da estrutura nativa da proteína. Esse fenômeno foi acompanhado por um aumento no espalhamento de luz, reforçando a evidência da dissociação estrutural da proteína em resposta ao agente desnaturante.

Figura 5: Espectros de fluorescência da HbAg, $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} no pH 7,0.

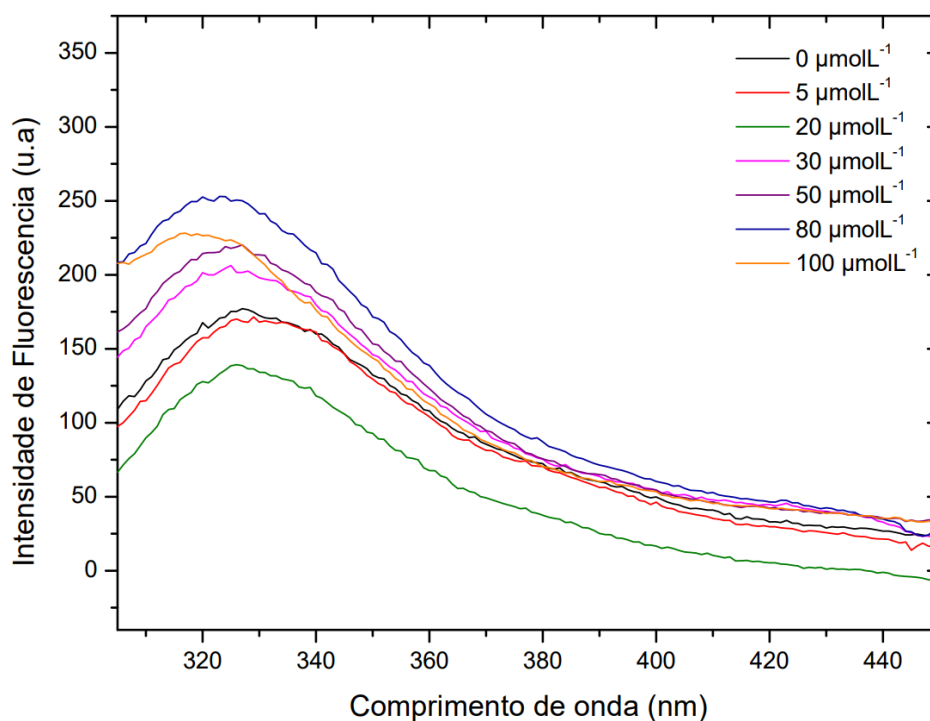
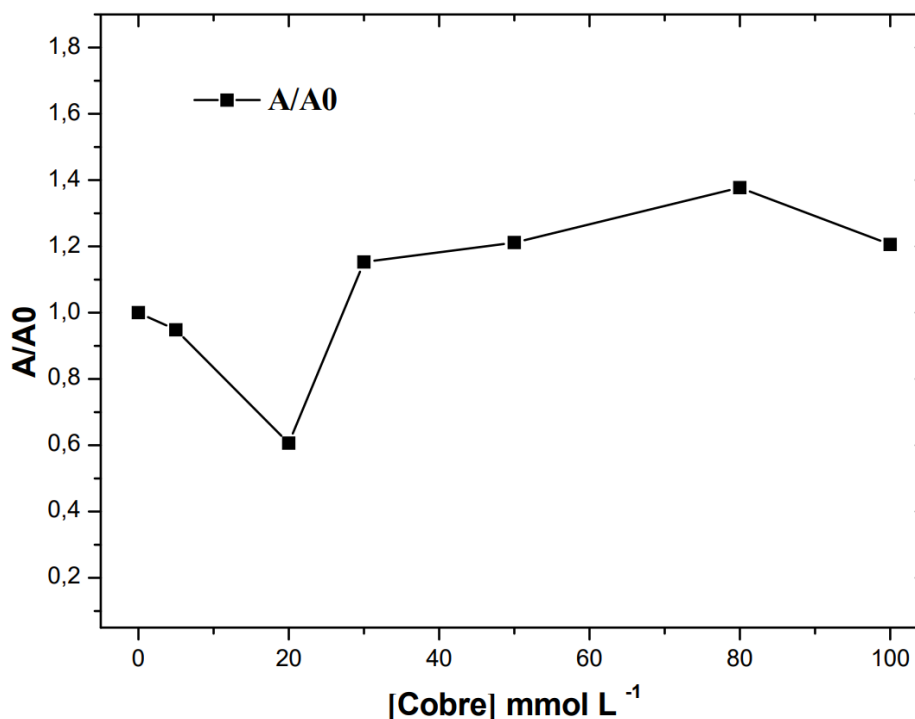


Figura 6: Área das curvas de intensidade de fluorescência da HbAg, 0,1 mg.mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L⁻¹ no pH 7,0 normalizada pela área da curva de intensidade de fluorescência na ausência de cobre.



As Figuras 7 e 8 apresentam, respectivamente, a distribuição do tamanho das partículas analisadas por intensidade de espalhamento de luz (DLS) referente a 1º e 24º horas de equilíbrio da HbAg na presença de diferentes concentrações de cobre, no pH 7,0. É possível constatar observando-se a Figura 7 que em um momento inicial não ocorram alterações significativas no diâmetro hidrodinâmico das partículas em concentrações de cobre inferiores a 30 µmol.L⁻¹ corroborando com os dados obtidos nas análises espectrofotométricas como indicativo de oxidação da proteína. Somente na concentração de 100 µmol.L⁻¹ de cobre foram detectadas alterações significativas, caracterizadas pelo aumento do diâmetro hidrodinâmico das partículas, fenômeno possivelmente decorrente da formação de agregados entre o metal e a proteína. Todavia, observando-se a Figura 8 infere-se tais alterações tiveram início na concentração de 10 µmol.L⁻¹ e se acentuaram a partir de 30 µmol.L⁻¹ de cobre. Na máxima concentração analisada, 100 µmol.L⁻¹ de cobre aparecem partículas com diâmetro hidrodinâmico superiores a 100 nm, evidenciando também a presença de duas populações de tamanhos distintos. Uma população com uma maior contribuição em torno de 100 nm, e uma segunda contribuição com menor intensidade e tamanho em torno de 10000 nm, evidenciando uma grande polidispersão da solução caracterizada pelo aumento de largura das curvas e podendo ser associada a agregação de proteína na presença de cobre (Oliveira *et al.*, 2020).

Através da observação das tabelas 1 e 2, é possível confirmar o aumento de polidispersão em função da concentração de cobre, além de constatar que existiram populações secundárias de baixa representatividade, podendo ser associada aos “Dust” (poeiras), com exceção da segunda população na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ após 24 horas de equilíbrio que apresenta alta representatividade. Comparando as Figuras 7 e 8 fica evidente que após 24 horas de equilíbrio, o sistema se encontra muito mais polidisperso e com partículas de tamanho maiores.

Figura 7: DLS de amostras de HbAg $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ submetidas a concentrações crescentes de CuSO_4 no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , pH 7,0 após 1 hora de equilíbrio.

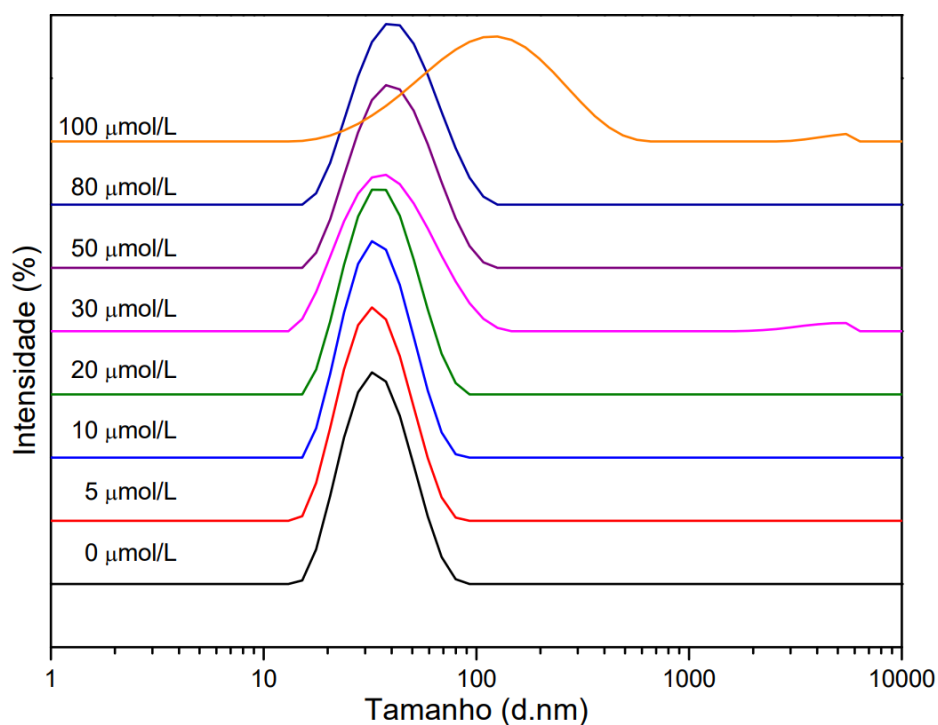


Tabela 1: Polidispersão (PDI), Diâmetro hidrodinâmico médio (D_h) e Área por intensidade (D_h) das populações observadas por DLS no pH 7,0 em função da $[CuSO_4]$ após 1 hora.

[Cu] ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	PDI	D_{h1} (nm)	D_{h2} (nm)	Dh1 (%)	Dh2 (%)
0	0,0979	32,27	-	100	-
5	0,0941	31,8	-	100	-
10	0,0925	32,54	-	100	-
20	0,1003	33,76	-	100	-
30	0,2021	36,95	4174	97,23	2,77
50	0,1514	38,48	-	100	-
80	0,1310	39,02	-	100	-
100	0,3359	93,57	4678	98,42	1,58

Figura 8: DLS de amostras de HbAg $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ submetidas a concentrações crescentes de $CuSO_4$ no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , pH 7,0 após 24 horas de equilíbrio.

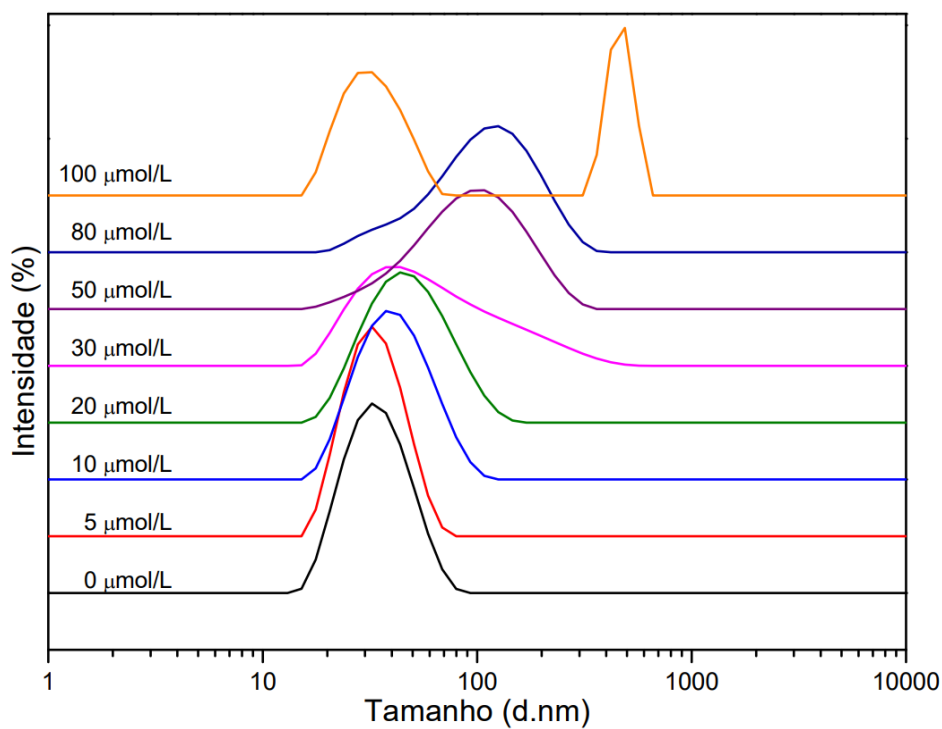


Tabela 2: Polidispersão (PDI), Diâmetro hidrodinâmico médio (D_h) e Área por intensidade (D_h) das populações observadas por DLS no pH 7,0 em função da $[CuSO_4]$ após 24 horas .

$[Cu]$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	PDI	D_{h1} (nm)	D_{h2} (nm)	Dh1 (%)	Dh2 (%)
0	0,0996	32,01	-	100	-
5	0,0813	34,39	-	100	-
10	0,1191	37,98	-	100	-
20	0,1409	43,29	-	100	-
30	0,2591	49,50	-	100	-
50	0,2264	79,10	-	100	-
80	0,2254	90,78	-	100	-
100	1,0000	33,39	466	62,69	37,32

5.2 Interação da HbAg com diferentes concentrações de cobre no pH 9,0

A Figura 9 apresenta os espectros de absorção ótica da HbAg 0,1 mg.mL⁻¹ na presença de diferentes concentrações de $CuSO_4$ no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L⁻¹, pH 9,0. Observa-se um deslocamento da banda de Soret, para comprimento de onda menores, em resposta ao aumento da concentração de $CuSO_4$, acompanhado por um aumento na intensidade de absorbância em 415 nm acima de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Cobre. Nas maiores concentrações analisadas observa-se um maior deslocamento da Banda de Soret de 415 para 404 nm, sugerindo a oxidação da HbAg (Figura 10).

A Figura 11 apresenta a intensidade de espalhamento de luz (LSI) em 350 nm em função da concentração de cobre, para HbAg no pH 9,0. Embora o padrão de aumento na intensidade de LSI com o aumento da concentração de $CuSO_4$ seja similar ao observado no pH 7,0, os valores de intensidade são relativamente menores. Essa diminuição na intensidade pode indicar uma dissociação parcial da proteína, corroborando a hipótese de que o ambiente alcalino facilita a oxidação inicial, seguida de mudanças estruturais que afetam o espalhamento de luz.

Figura 9: Espectros de absorção ótica da HbAg $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ submetidas a concentrações crescentes de CuSO_4 no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , pH 9,0.

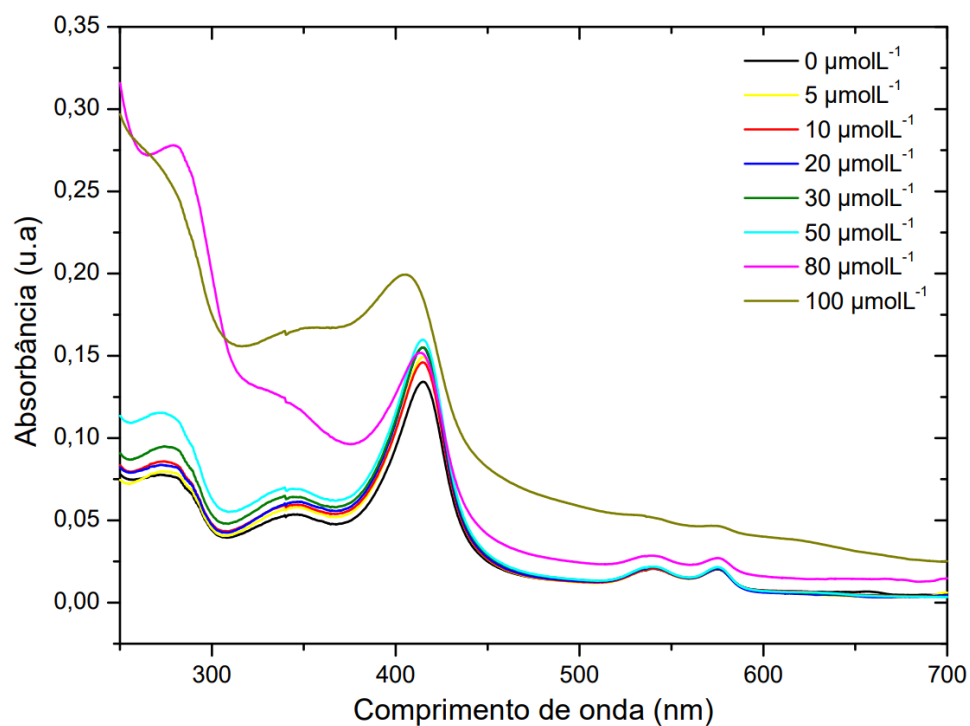


Figura 10: Intensidade de absorção monitorada em 415 nm e comprimento de onda (λ) máximo da banda de Soret da HbAg em função de diferentes concentrações de CuSO_4 no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , pH 9,0.

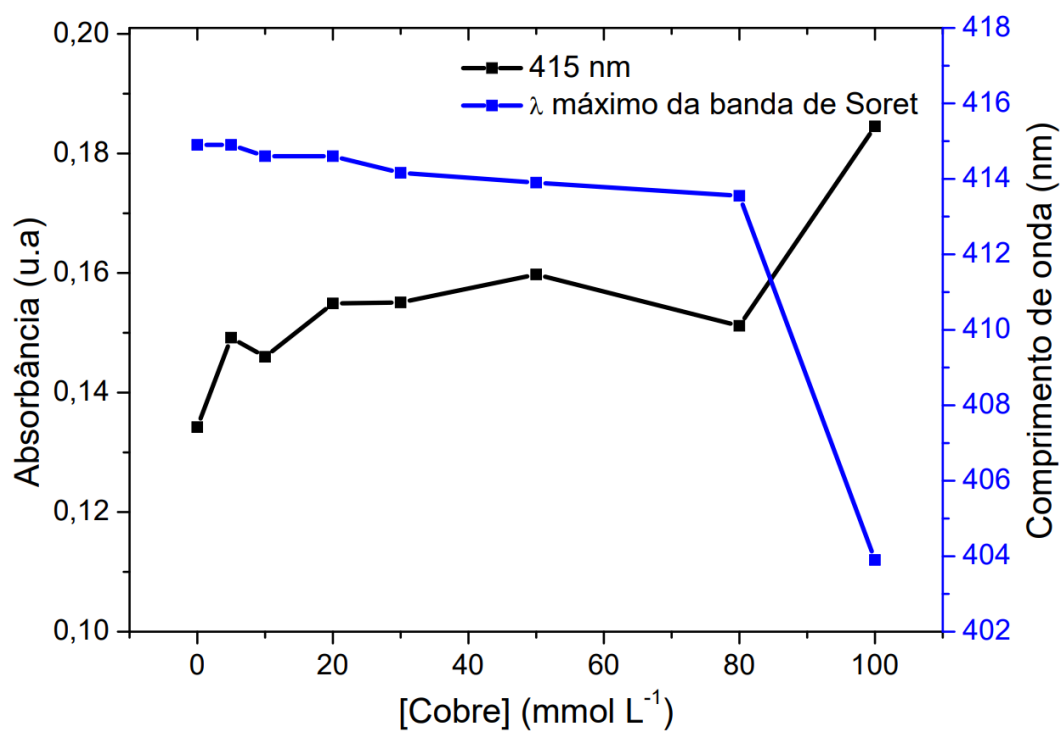
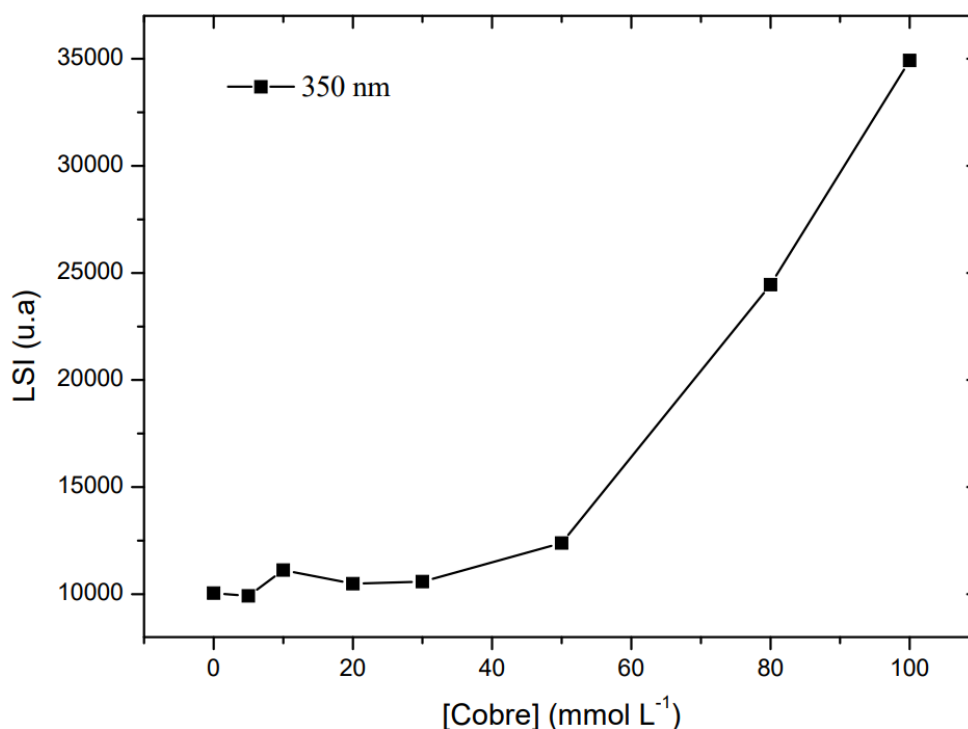


Figura 11: Intensidade de espalhamento de luz em 350 nm da HbAg 0,1 mg.mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L⁻¹, pH 9,0, em função da concentração de CuSO₄



Na Figura 12 são apresentados os espectros de fluorescência da HbAg em diferentes concentrações de CuSO₄ no pH 9,0. A intensidade de fluorescência aumentou significativamente em concentrações superiores a 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, o que sugere a exposição de aminoácidos fluorescentes, como o triptofano, devido à dissociação estrutural da proteína. Esse comportamento é similar ao observado no pH 7,0, todavia o aumento da intensidade de fluorescência é mais expressivo que no pH 7,0. Este fenômeno pode ser associado ao fato de que a HbAg apresenta menor estabilidade no pH 9,0 do que no pH 7,0. No pH 9,0 a intensidade de fluorescência aumentou em um fator 2 (Figura 13), enquanto que no pH 7,0 aumentou um fator 1,4 em relação a curva de fluorescência na ausência de cobre (Figura 6) (Oliveira *et al.* 2020).

A Figura 14 mostra os dados de DLS da HbAg na presença de diferentes concentrações de cobre após 1 hora de equilíbrio no pH 9,0. Acima de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ CuSO₄, as curvas de distribuição de tamanho se alargam, indicando a formação de agregados ou uma modificação estrutural inicial da HbAg em resposta ao cobre. A presença de uma segunda população em concentrações acima de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sugere um processo de agregação dependente da concentração, acelerado pelo pH alcalino.

Na Figura 15, após 24 horas de equilíbrio, observa-se maior expressão do fenômeno

de agregação observado na Figura 12. A segunda população de tamanhos se torna mais evidente em concentrações de CuSO_4 acima de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, especialmente em $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, onde é possível visualizar agregados maiores. Esse comportamento evidencia uma instabilidade crescente da HbAg em pH 9,0, levando à formação de complexos proteína-metal em função do tempo. Todos estes dados estão sumarizados na Tabela 3 e 4 respectivamente, mais uma vez enfatizando a menor estabilidade da proteína quando em pH alcalino (Oliveira *et al.* 2020).

Figura 12: Espectros de fluorescência da HbAg, $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} no pH 9,0.

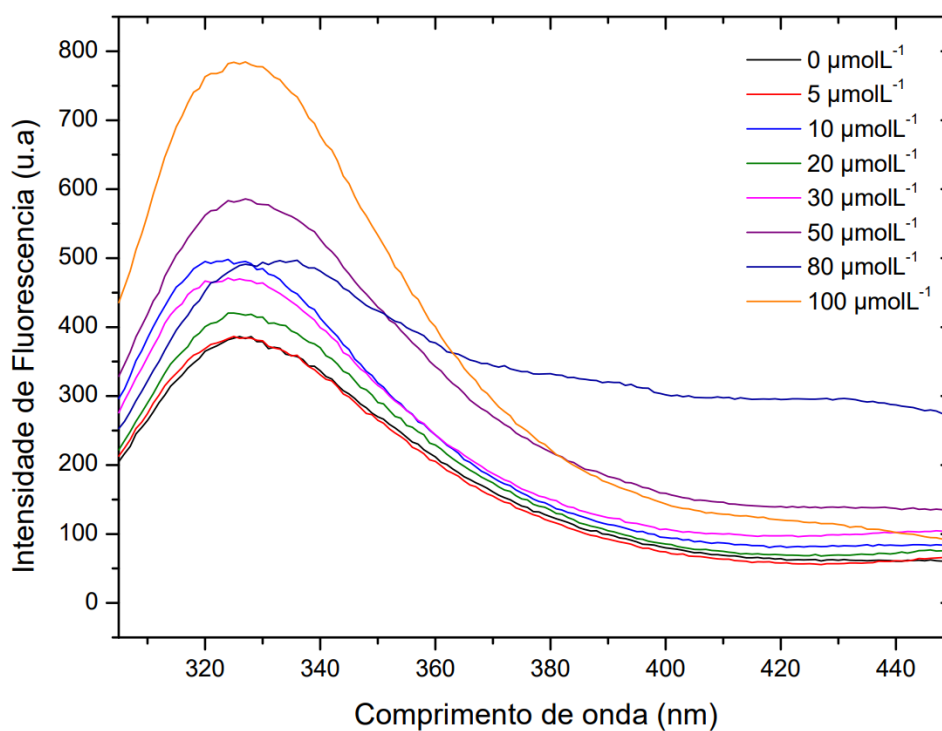


Figura 13: Área das curvas de intensidade de fluorescência da HbAg, $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} no pH 9,0 em razão da área da curva de intensidade de fluorescência na ausência de cobre.

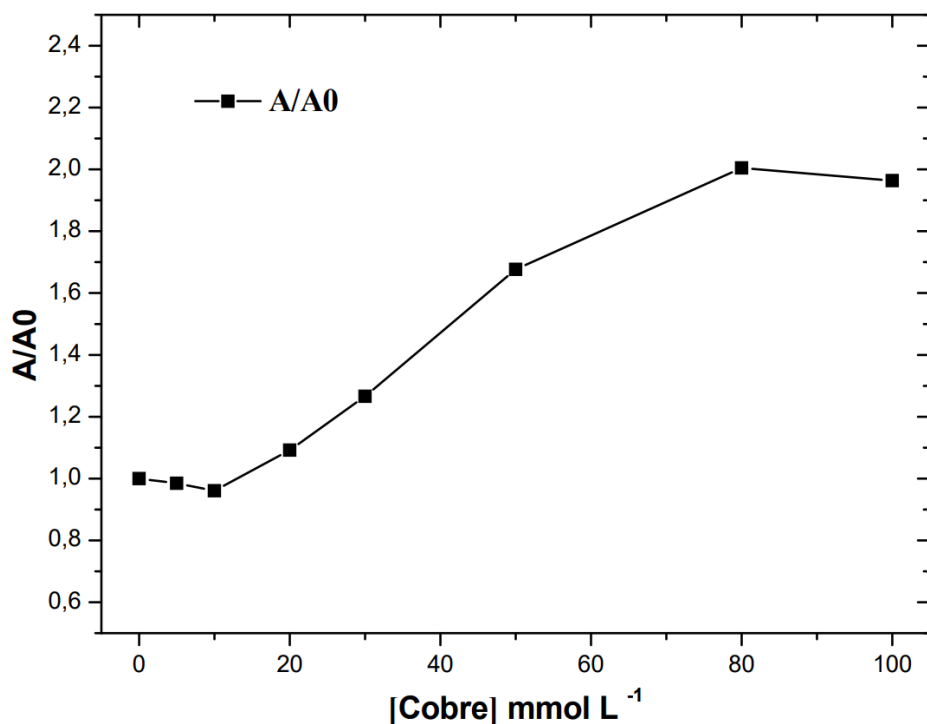


Figura 14: DLS de amostras de HbAg $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ submetidas a concentrações crescentes de CuSO_4 no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , pH 9,0 após 1 horas de equilíbrio.

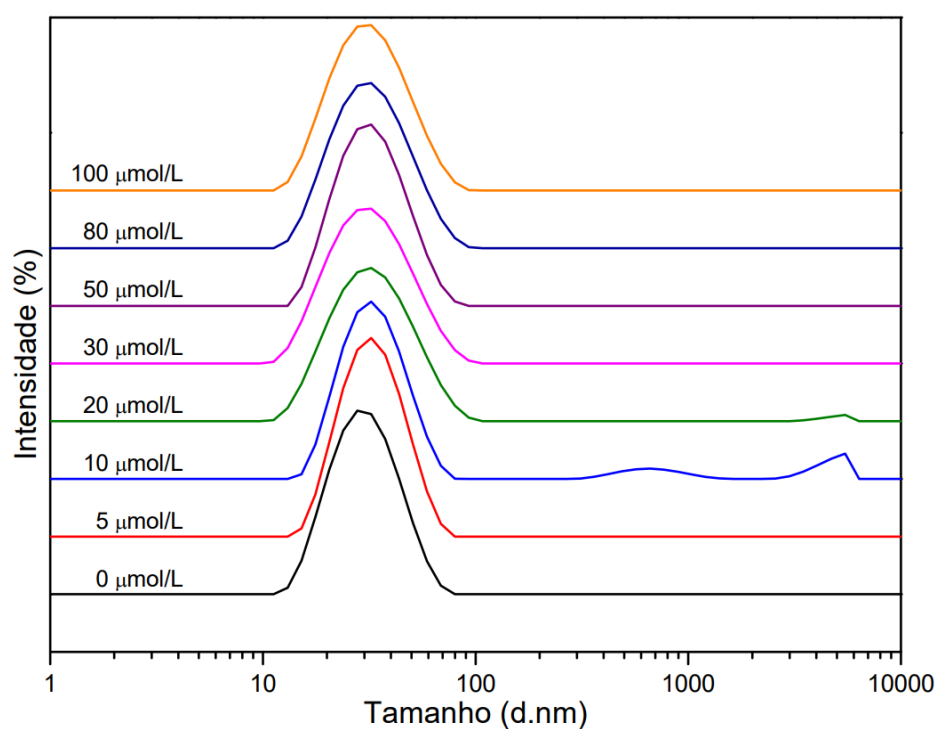


Tabela 3: Polidispersão (PDI), Diâmetro hidrodinâmico médio (D_h) e Área por intensidade (D_h) das populações observadas por DLS no pH 9,0 em função da $[CuSO_4]$ após 1 hora

$[Cu]$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	PDI	D_{h1} (nm)	D_{h2} (nm)	D_{h1} (%)	D_{h2} (%)
0	0,1064	28,99	-	100	-
5	0,0922	30,78	-	100	-
10	0,2469	38,39	-	100	-
20	0,1804	30,54	4830	98,75	1,25
30	0,1418	29,14	-	100	-
50	0,1400	30,68	-	100	-
80	0,1400	29,85	-	100	-
100	0,1451	29,85	-	100	-

Figura 15: DLS de amostras de HbAg $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ submetidas a concentrações crescentes de $CuSO_4$ no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} , pH 9,0 após 24 horas de equilíbrio.

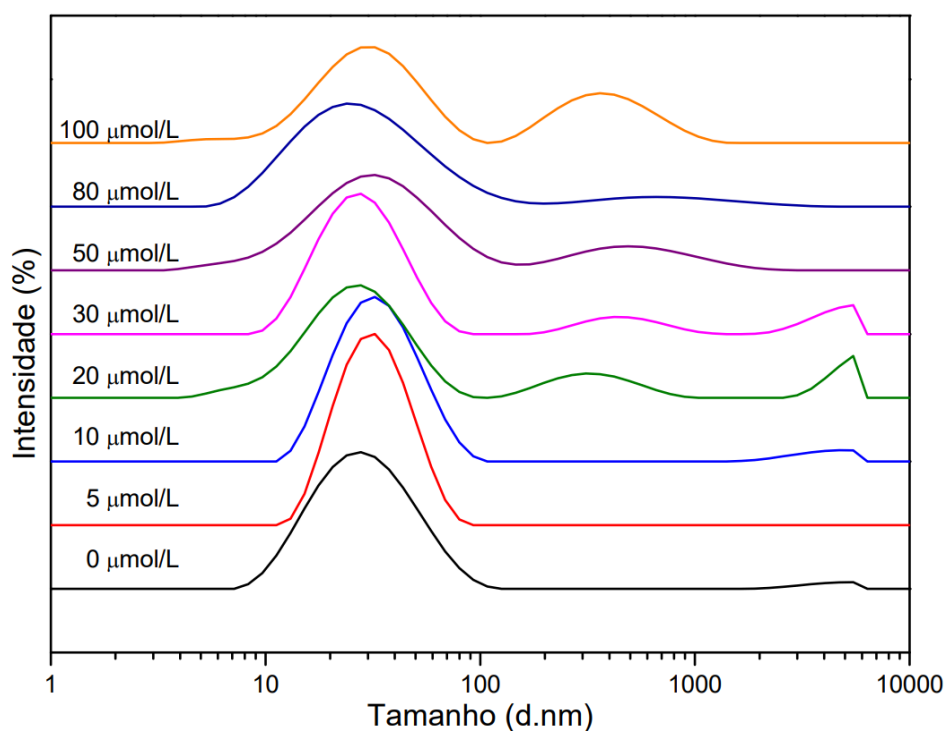


Tabela 4: Polidispersão (PDI), Diâmetro hidrodinâmico médio (D_h) e Área por intensidade (D_h) das populações observadas por DLS no pH 9,0 em função da $[CuSO_4]$ após 24 horas.

$[Cu](\mu\text{mol.L}^{-1})$	PDI	$D_{h1}(\text{nm})$	$D_{h2}(\text{nm})$	$D_{h3}(\text{nm})$	Dh1 (%)	Dh2(%)	Dh3(%)
0	0,2475	26,49	4197	-	98,14	1,86	-
5	0,1206	29,50	-	-	100	-	-
10	0,2305	31,96	3927	-	95,37	4,63	-
20	0,3850	28,38	354,4	4743	77,44	14,41	8,15
30	0,3843	32,23	488,5	4297	81,98	9,40	8,62
50	0,3926	33,38	603,8	80.14	19,86	-	-
80	0,3599	34,44	885	-	90,95	9,05	-
100	0,4628	39,57	422,4	-	66,39	33,21	-

A sensibilidade aumentada da HbAg ao cobre em pH alcalino destaca a possibilidade de explorar diferentes condições de operação para melhorar a resposta a contaminantes específicos. Estudos futuros terão foco na otimização da seletividade desse sistema, incorporando ferramentas avançadas, como docagem molecular, ou associando a HbAg a enzimas seletivas para metais pesados ou agrotóxicos. Essa abordagem abrirá novas oportunidades para o uso da HbAg em tecnologias de monitoramento ambiental, ampliando sua aplicabilidade em cenários reais de detecção.

6. CONCLUSÃO

A HbAg apresentou estabilidade significativa em concentrações de $CuSO_4$ até 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ após 1 hora em pH 7,0, enquanto em pH 9,0 a estabilidade foi comprometida em concentrações acima de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no mesmo período. No entanto, a proteína apresentou processos de agregação e dissociação oligomérica em concentrações superiores a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ após 24 horas, independentemente do pH. Esses resultados indicam que a HbAg possui potencial promissor para aplicações em sensores biológicos, especialmente em condições de pH neutro e baixas concentrações de $CuSO_4$, onde demonstra maior estabilidade estrutural. Todavia se faz necessário estudos para otimização de sua sensibilidade e seletividade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, W.; ALHARTHY, R. D.; ZUBAIR, M.; AHMED, M.; HAMEED, A.; RAFIQUE, S. Toxic and heavy metals contamination assessment in soil and water to evaluate human health risk. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 17006, 2021.

ALAYASH, A. I. Hemoglobin-based blood substitutes: oxygen carriers, pressor agents, or oxidants? **Nature biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 545-549, 1999.

AMARAL, A.; SOTO, M.; CUNHA, R.; MARIGÓMEZ, I.; RODRIGUES, A. Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 1, p. 103-108, 2006.

BARTZ, M. L. C.; DUDAS, R. T.; DEMETRIO, W. C.; BROWN, G. G. Earthworms as soil health indicators in no-tillage agroecosystems. **European Journal of Soil Biology**, v. 121, p. 103605, 2024.

CALISI, A.; LIONETTO, M. G.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; SCHETTINO, T. Effect of heavy metal exposure on blood haemoglobin concentration and methemoglobin percentage in *Lumbricus terrestris*. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 847-854, 2011.

CALISI, A.; LATINO, M. E.; CORALLO, A.; GRIMALDI, A.; FERRONATO, C.; ANTISARI, L. V.; DONDERO, F. Biomarkers in Soil Organisms: Their Potential use in the Assessment of Soil Pollution and Remediation. In: **Bioremediation of Agricultural Soils**. CRC press, 2019. p. 262-285.

CARVALHO, Francisco Adriano de Oliveira. Estudo da estabilidade oligomérica da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) na presença de agentes caotrópicos e caracterização das subunidades. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CARVALHO, F. A. O.; ALVES, F. R.; CARVALHO, J. W.; TABAK, M. Guanidine hydrochloride and urea effects upon thermal stability of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp). **International journal of biological macromolecules**, v. 74, p. 18-28, 2015.

CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2144-2151, 2011.

CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

CHADHA, U.; BHARDWAJ, P.; AGARWAL, R.; RAWAT, P.; AGARWAL, R.; GUPTA, I.; CHAKRAVORTY, A. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 109, p. 21-51, 2022.

CHEN, Z.; ZHANG, Z.; QI, J.; YOU, J.; MA, J.; CHEN, L. Colorimetric detection of heavy metal ions with various chromogenic materials: Strategies and applications. **Journal of hazardous materials**, v. 441, p. 129889, 2023.

CRISTINA, R. T.; BAROGA, M.; DUMITRESCU, E.; MUSELIN, F.; DOMA, A. O.; MANEA, D.; BANATEAN-DUNEA, I. Use of *Eisenia fetida* as a Biological Risk Marker in a Qualitative Eco Assessment Test of a Romanian Watercourse. **Biology**, v. 11, n. 6, p. 820, 2022.

CUNHA, L.; CAMPOS, I.; MONTIEL, R.; RODRIGUES, A.; MORGAN, A. J. Morphometry of the epidermis of an invasive megascolecid earthworm (*Amyntas gracilis*, Kinberg 1867) inhabiting actively volcanic soils in the Azores archipelago. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 1, p. 25-32, 2011.

DAWOOD, M.; WAHID, A.; HASHMI, M. Z.; MUKHTAR, S.; MALIK, Z. Use of earthworms in **Biomonitoring of Soil Xenobiotics**. Xenobiotics in the soil environment: monitoring, toxicity and management, p. 73-88, 2017.

EKPERUSI, O. A.; AIGBODION, F. I. Bioremediation of petroleum hydrocarbons from crude oil-contaminated soil with the earthworm: *Hyperiodrilus africanus*. **Biotech**, v. 5, p. 957-965, 2015.

FALCO, L.; COVIELLA, C. Contribución de *Amyntas gracilis* (Megascolecidae) y de *Octolasion cyaneum* (Lumbricidae) a la estabilidad física del suelo: una experiencia en mesocosmos. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**, Universidad Nacional de Cuyo, v. 48, n. 1, p. 115-127, 2016.

FERENZ, K. B.; STEINBICKER, A. U. Artificial oxygen carriers—past, present, and future—a review of the most innovative and clinically relevant concepts. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 369, n. 2, p. 300-310, 2019.

JIANG, H. H.; CAI, L. M.; WEN, H. H.; HU, G. C.; CHEN, L. G.; LUO, J. An integrated approach to quantifying ecological and human health risks from different sources of soil heavy metals. **Science of the Total Environment**, v. 701, p. 134466, 2020.

MORAES, M. F. **Micronutrientes e metais pesados tóxicos: do fertilizante ao produto agrícola**, 2009. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo.

NARESH, V.; LEE, N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1109, 2021.

NASCIMENTO, E. D.; ABRANTES-COUTINHO, V. E.; OLIVEIRA, T. M.; SANTIAGO, P. S.; CARVALHO, F. A. O. Biorecognition of hydrogen peroxide using a novel electrochemical platform designed with *Glossoscolex paulistus* giant hemoglobin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 12, p. 3729-3739, 2022.

OLIVEIRA, J. B. S.; RAMOS, L.; SOUZA, C. O.; SEBASTIÃO, I.; CARUSO, C.; CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S. Initial biophysical characterization of *Amyntas gracilis* giant extracellular hemoglobin (HbAg). **European Biophysics Journal**, v. 49, p. 473-484, 2020.

RAMOS, L. **Estudos biofísicos da Hemoproteína extracelular de Amyntas gracilis (HbAg) na ausência e na presença de surfactantes**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara 2017.

RASHID, A.; SCHUTTE, B. J.; ULERY, A.; DEYHOLOS, M. K.; SANOGO, S.; LEHNHOFF, E. A.; BECK, L. Heavy metal contamination in agricultural soil: environmental pollutants affecting crop health. **Agronomy**, v. 13, n. 6, p. 1521, 2023.

ROUSE, W. G.; PLEIJEL, F. **Annelida. Zootaxa**, v. 1668, n. 1, p. 245–264, 2007.

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

SANTIAGO, P. S.; CARVALHO, F. A. O.; DOMINGUES, M. M.; CARVALHO, J. W. P.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Isoelectric Point Determination for *Glossoscolex paulistus* Extracellular Hemoglobin: Oligomeric Stability in Acidic pH and Relevance to Protein–Surfactant Interactions. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9794-9801, 2010.

SANTOS, N. L.; ANJOS, S. A.; José Ângelo; KLAMMLER, H. Exposição da Zona Urbana de Boquira, estado da Bahia, aos Metais Tóxicos Associados à Bacia de Rejeito de Mineração Abandonada. *Anuário do Instituto de Geociências*, v. 43, n. 3, 2020.

SOUZA, C. O. **Caracterização e imobilização da hemoglobina extracelular de *Amynthus gracilis* em substrato sólido visando a elaboração de biossensores de contaminação ambiental**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

SUN, F. S.; YU, G. H.; ZHAO, X. Y.; POLIZZOTTO, M. L.; SHEN, Y. J.; ZHOU, H. B.; HE, X. S. Mechanisms of potentially toxic metal removal from biogas residues via vermicomposting revealed by synchrotron radiation-based spectromicroscopies. **Waste Management**, v. 113, p. 80-87, 2020.

TIMM, B.; ELMER, J. Enhancing the stability of *Lumbricus terrestris* Erythrocrucorin (LtEc) for use as a blood substitute. In: **Nanobiotherapeutic based blood substitutes**. 2022. p. 541-569.

VELUSAMY, K.; PERIYASAMY, S.; KUMAR, P. S.; RANGASAMY, G.; PAULINE, J. M. N.; RAMARAJU, P.; VO, D. V. N. Biosensor for heavy metals detection in wastewater: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 168, p. 113307, 2022.

WANG, K.; QIAO, Y.; LI, H.; HUANG, C. Use of integrated biomarker response for studying the resistance strategy of the earthworm *Metaphire californica* in Cd-contaminated field soils in Hunan Province, South China. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 114056, 2020.

WANG, Q. Y.; SUN, J. Y.; XU, X. J.; YU, H. W. Integration of chemical and toxicological tools to assess the bioavailability of copper derived from different copper-based fungicides in soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 662-668, 2018.

XIANG, M.; LI, Y.; YANG, J.; LEI, K.; LI, Y.; LI, F.; CAO, Y. Heavy metal contamination risk assessment and correlation analysis of heavy metal contents in soil and crops. **Environmental Pollution**, v. 278, p. 116911, 2021.

XU, Z.; ZHANG, Q.; LI, X.; HUANG, X. A critical review on chemical analysis of heavy metal complexes in water/wastewater and the mechanism of treatment methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 429, p. 131688, 2022.

YUVARAJ, A.; KARMEGAM, N.; THANGARAJ, R. Vermistabilization of paper mill sludge by an epigeic earthworm *Perionyx excavatus*: mitigation strategies for sustainable environmental management. **Ecological Engineering**, v. 120, p. 187-197, 2018.