

Claudemir Oliveira Souza

Avaliação do uso da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) na elaboração de detectores óticos de contaminação ambiental

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.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Soares Santiago

Araraquara - SP

2023

S729a Souza, Claudemir Oliveira
Avaliação do uso da hemoglobina extracelular de
Amyntas gracilis (HbAg) na elaboração de detectores
óticos de contaminação ambiental / Claudemir Oliveira
Souza. -- Araraquara, 2023
92 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Patrícia Soares Santiago

1. Hemoglobina. 2. Anelídeo. 3. Biossensores. 4.
Metais pesados. 5. Voltametria. 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: "Avaliação do uso da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) na elaboração de detectores óticos de contaminação ambiental"

AUTOR: CLAUDEMIR OLIVEIRA SOUZA

ORIENTADORA: PATRICIA SOARES SANTIAGO

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)

Departamento de Agronomia e Recursos Naturais / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP – Registro



Prof. Dr. ERICK GUIMARÃES FRANÇA (Participação Virtual)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro - IFTM – Ituiutaba



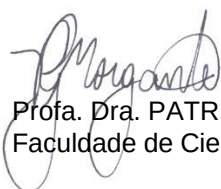
Prof. Dr. LEVI POMPERMAYER MACHADO (Participação Virtual)

Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP – Registro



Prof. Dr. LUCAS FERREIRA DE PAULA (Participação Virtual)

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM – Iturama



Profa. Dra. PATRÍCIA GLEYDES MORGANTE (Participação Virtual)

Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP - Registro

Araraquara, 07 de julho de 2023

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

É necessário buscar moléculas capazes de detectar metais pesados no meio ambiente devido a acumulação dessas substâncias provenientes de processos industriais e agrícolas. Estudos utilizando anelídeos como bioindicadores são uma forma de identificar áreas contaminadas por metais pesados. Neste trabalho foi proposto o uso da hemoglobina de *Amyntas gracilis* como um biossensor ótico de detecção de metais pesados.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

It is necessary to search for molecules capable of detecting heavy metals in the environment due to the accumulation of these substances from industrial and agricultural processes. Studies using annelids as bioindicators are one way to identify areas contaminated by heavy metals. In this work, we propose the use of *Amyntas gracilis* hemoglobin as an optical biosensor to detect heavy metals.

DADOS CURRICULARES

Identificação

Nome: Claudemir Oliveira Souza

Nome em citações bibliográficas: SOUZA, C.O.; SOUZA, CLAUDEMIR OLIVEIRA; C. SOUZA; OLIVEIRA, C. S.;

Endereço Profissional: Instituto Federal do Triângulo Mineiro. R. João Batista Ribeiro, 4000 - Distrito Industrial II, Uberaba - MG, 38064-790.

Formação Acadêmica/ Titulação

Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis – IFSP, Campus Matão
Mestrado em Biotecnologia – Unesp, IQ Araraquara

Atuação profissional: Técnico de Laboratório – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Campus Uberaba

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. 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. Initial biophysical characterization of *Amyntas gracilis* giant extracellular hemoglobin (HbAg). Eur. Biophys. J., v.49, p.473 - 484, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01455-8>
2. FELIPE, ANNA LUIZA DINIZ; **SOUZA, CLAUDEMIR OLIVEIRA**; SANTOS, LEANDRO FERREIRA; CESTARI, ALEXANDRE. Synthesis and characterization of mead: from the past to the future and development of a new fermentative route. Journal of Food Science and Technology, v. 56, p. 4966-4971, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03968-3>

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. **SOUZA, C. O.**; OLIVEIRA, A. R.; O CENÁRIO ATUAL DA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS DIANTE DAS DENÚNCIAS DE DESVIO DE RECURSOS DA PETROBRÁS. In: 10º Congresso sobre Geração Distribuída e Energia no Meio Rural, 2015, São Paulo. X Agrener 2015. São Paulo: IEE USP, 2015. v. X. p. 33-33.
2. SHIMADA, G. B.; **SOUZA, C. O.**; ARAUJO, Y. F. T.; CESTARI, A.; ADSORÇÃO DE ÓLEO DE SOJA, BIODIESEL E ÓLEO DIESEL POR MATERIAIS OBTIDOS PELO MÉTODO SOL-GEL HIDROLÍTICO. In: Encontro Brasileiro sobre Adsorção, 2014, Guarujá. 10º Encontro Brasileiro sobre Adsorção, 2014. v. 10.
3. **SOUZA, C. O.**; SHIMADA, G. B.; ARAUJO, Y. F. T.; CESTARI, A. REMOÇÃO DE CRÔMIO CONTIDO EM RESÍDUOS DE COURO “WET-BLUE” E SEU REAPROVEITAMENTO NOS PROCESSOS INDUSTRIAIS DE CURTUMES.

In: 10 Encontro sobre Adsorção, 2014, Guarujá. X Encontro Sobre Adsorção, 2014.

Resumos publicados em anais de congressos

1. SANTIAGO, P. S.; RAMOS, L.; IZUMI, K. S.; **SOUZA, C. O.**; SEBASTIÃO, I.; BERTINI, G. CONFORMATIONAL CHANGES OF FRESHWATER SHRIMP HEMOCYANIN INDUCED BY UREA. In: 20th IUPAB Congress, 50th Annual SBBq Meeting, 45th Annual SBBf Meeting, 2021
2. **SOUZA, CLAUDEMIR OLIVEIRA**; RAMOS, L. ; SEBASTIAO, I. ; MORAES, M. L. ; SANTIAGO, P. S. . Use of Hemoglobins for metal biosensing. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2019, Santos. SBBF2019, 2019. v. 0. p. 0.
3. SEBASTIAO, I. ; **SOUZA, C. O.** ; RAMOS, L. ; MORGANTE, P. G. ; SANTIAGO, P. S. . Interaction of the monomer d of the extracellular hemoglobin of *Amyntas gracilis* (HbAg) with the anionic surfactant sodium dodecil sulfate (SDS). In: Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2019, Santos. Sbbf 2019, 2019.
4. **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). In: 47ª Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2018, Joinville, SC. Anais da 47ª Reunião da SBBq. São Paulo: SBBq, 2018. v. 47.
5. 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* (HcMa). In: 47ª Reunião Anual da SBBq, 2018, Joinville, SC. 47ª Reunião Anual da SBBq. São Paulo: SBBq, 2018. v. 47.
6. MORAES, C. M. ; **SOUZA, C. O.** ; ROZANE, D. E. ; SEBASTIAO, I. ; SANTIAGO, P. S. ; MACHADO, L. P. . Análises químicas comparativas do produto bioestimulante agrícola derivado da macroalga *Ascophyllum nodosum* e do extrato da macroalga nativa *Osmundaria obtusiloba*. In: 3º Simpósio Sul-Sudeste de Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2018, Registro. III SIMPESCA, 2018.
7. ZACHARCZUK, S. S. A. ; MORAES, C. M. ; **SOUZA, C. O.** ; SANTOS-FILHO, N. A. ; MACHADO, L. P. . Variação espacial do conteúdo protéico de *Pyropia spirallis* no litoral sul de São Paulo.. In: 3º Simpósio Sul-Sudeste de Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2018, Registro. III SIMPESCA, 2018.
8. **SOUZA, C. O.**; RAMOS, L.; SEBASTIAO, I. ; MORAES, M. L. ; SANTIAGO, P. S. . Sensitivity of detection of copper and cadmium using annelid hemoglobin. In: XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2018, Santos. scientific program of XLIII Annual Meeting of Brazilian Biophysical Society. São Paulo: SBBF, 2018. v. 43. p. 123-123.
9. SEBASTIAO, I. ; OLIVEIRA, J. B. S. ; OHYA, M. C. ; **SOUZA, C. O.** ; RAMOS, L. ; SANTIAGO, P. S. . Purification and estimation of the isoelectric point (pI) of the monomer d of the extracelullar hemoglobin of *Amyntas gracilis*. In: XLIII

- Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2018, Santos. Scientific program, 2018.
10. RAMOS, L. ; FARIA, G. H. A. ; **SOUZA, C. O.** ; OLIVEIRA, J. B. S. ; SANTIAGO, P. S. . Biophysical Characterization of a Freshwater Shrimp Hemocyanin of *Macrobrachium acanthurus* (HcMa). In: XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2018, Santos. scientific program, 2018.
 11. **SOUZA, C. O.**; CAMPOS, R. A. ; RAMOS, L. ; OLIVEIRA, J. B. S. ; SANTIAGO, P. S. . Effect of copper heavy metal on the giant extracellular hemoglobin of *Amyntas gracilis* aiming the elaboration of biosensors of environment contamination. In: 46a. Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2017, Águas de Lindóia. Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2017.
 12. MORAES, C. M. ; **SOUZA, C. O.** ; RAMOS, L. ; SANTIAGO, P. S. ; ROZANE, D. E. ; MACHADO, L. P. . Proteínas totais de *Osmundaria obtusiloba* (Rhodophyta) em comparação ao bioestimulante comercial à base de macroalga. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017, Registro. XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017.
 13. SOUZA, L. V. ; SANTIAGO, P. S. ; **SOUZA, C. O.** ; CAMPOS, R. A. ; RAMOS, L. . Estudo do surfactante aniônico, SDS, na hemoglobina *Amyntas gracilis* (HbAg) em pH 7,0. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017, Registro. XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017.
 14. OHYA, M. C. ; OLIVEIRA, J. B. S. ; **SOUZA, C. O.** ; CAMPOS, R. A. ; SANTIAGO, P. S. . Extração e purificação do monômero d da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) através da técnica de cromatografia. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017, Registro. XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017.
 15. RAMOS, R. A. ; **SOUZA, C. O.** ; SANTIAGO, P. S. . Imobilização da hemoglobina de *Amyntas gracilis* (HbAg) em PEI visando a elaboração de biossensores de contaminação ambiental. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017, Registro. XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017.
 16. RAMOS, L. ; SOUZA, L. V. ; **SOUZA, C. O.** ; OLIVEIRA, J. B. S. ; SANTIAGO, P. S. . Interaction of extracellular hemoglobin of *Amyntas gracilis* (HbAg) with cationic surfactant CTAC: Effects of oligomeric dissociation and oxidation. In: 46^a Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq, 2017, Águas de Lindóia. 46^a Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2017.
 17. OLIVEIRA, J. B. S. ; CARUSO, C. S. ; **SOUZA, C. O.** ; RAMOS, L. ; SANTIAGO, P. S. . Determination of isoelectric point of Giant Hemoglobin of *Amyntas gracilis* (HbAg) and thermal stability studies upon the pH effect. In: 46^a Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq, 2017, Águas de Lindóia. 46^a Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq, 2017.
 18. CAMPOS, R. A. ; **SOUZA, C. O.** ; RAMOS, L. ; SANTIAGO, P. S. . Effect of heavy metal Cadmium in extracelular hemoglobin of *Amyntas gracilis* (HbAg). In: 46^a Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular

- Biology - SBBq, 2017, Águas de Lindóia. 46^a Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq, 2017.
19. CAMPOS, R. A. ; **SOUZA, C. O.** ; SANTIAGO, P. S. . Interação da hemoglobina gigante de *Amyntas gracilis* com cobre e cádmio: potencial uso como biossensor de contaminação ambiental. In: XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2017, Registro. XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2017.
 20. SANTIAGO, P. S. ; OLIVEIRA, J. B. S. ; RAMOS, L. ; **SOUZA, C. O.** ; MORGANTE, P. G. . Interaction of the extracellular hemoglobin of *Amyntas gracilis* (HbAg) with ionic surfactants. In: 19th IUPAB congress and 11th EBSA congress, 2017, Edinburgh, United Kingdom. New York: Springer, 2017. v. 46. p. S-352-S-352.
 21. SANTIAGO, P. S. ; **SOUZA, C. O.** ; RAMOS, R. A. Immobilization of Extracellular Hemoglobin *Amyntas gracilis* on PAH And PEI Substrates Aiming at the Elaboration of Environmental Contamination Biosensors. In: XLII Brazillian Biophysical society congress, 2017, Santos. Scientific program, 2017. p. 263-263.

Apresentações de trabalho

1. **SOUZA, C. O.**; RAMOS, L. ; SEBASTIAO, I. ; MORAES, M. L. ; SANTIAGO, P. S. . Use of Hemoglobins for metal biosensing. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. SEBASTIAO, I. ; **SOUZA, C. O.** ; RAMOS, L. ; MORGANTE, P. G. ; SANTIAGO, P. S. . Interaction of the monomer d of the extracellular hemoglobin of *Amyntas gracilis* (HbAg) with the anionic surfactant sodium dodecil sulfate (SDS). 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. **SOUZA, C. O.**; CAMPOS, R. A. ; RAMOS, L. ; OLIVEIRA, J. B. S. ; SANTIAGO, P. S. . Effect of copper heavy metal on the giant extracellular hemoglobin of *Amyntas gracilis* aiming the elaboration of biosensors of environment contamination.. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. OLIVEIRA, J. B. S. ; CARUSO, C. S. ; **OLIVEIRA, C.S.** ; RAMOS, L. ; SANTIAGO, P. S. . Determination of isoelectric point of Giant Hemoglobin of *Amyntas gracilis* (HbAg) and thermal stability studies upon the pH effect. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. CAMPOS, R. A. ; **SOUZA, C. O.** ; RAMOS, L. ; SANTIAGO, P. S. . Effect of heavy metal Cadmium in extracelular hemoglobin of *Amyntas gracilis* (HbAg). 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. RAMOS, L. ; SOUZA, L. V. ; **SOUZA, C. O.** ; OLIVEIRA, J. B. S. ; SANTIAGO, P. S. . Interaction of extracellular hemoglobin of *Amyntas gracilis* (HbAg) with cationic surfactant CTAC: Effects of oligomeric dissociation and oxidation. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
7. **SOUZA, C. O.**; OLIVEIRA, A. R. . Análise do impacto das denúncias à Petrobrás no mercado de etanol e biodiesel. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
8. **SOUZA, C. O.**; OLIVEIRA, A. R. O Cenário Atual da Produção de Biocombustíveis diante das denúncias de desvios de recursos da Petrobrás. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

9. **SOUZA, C. O.**; SHIMADA, G. B. ; ARAUJO, Y. F. T. ; CESTARI, A. . Remoção de crômio contido em resíduos de couro '*Wet-blue*' e seu reaproveitamento nos processos industriais de curtumes. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. **SOUZA, C. O.**; SILVA, J. C. R. ; CARDOSO, A. M. . Elaboração de meios de cultivo para o fungo *Batkoa* sp. visando o controle da cigarrinha da cana de açúcar, *Mahanarva fimbriolata*. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. FELIPE, A. L. D. ; **SOUZA, C. O.** ; SILVA, J. C. R. . Uso de vinhaça para produção de invertase a partir de fungos filamentosos. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. **SOUZA, C. O.**; FELIPE, A. L. D. ; SANTOS, L. F. ; CESTARI, A. . Análise da produção de hidromel por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Produção técnica

1. Aulas de produção de açúcar e etanol ministradas. 2019. (Curso de curta duração ministrado/Outra).
2. Extração e quantificação de proteínas de macroalgas. 2017. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Produção artística e cultural

1. **SOUZA, C. O.**; SILVA, R. C. *Física e Cálculo*. 2013. (Letra original de música).
2. **SOUZA, C. O.**; MESQUITA, D. B. ; MARTINS, M. D. ; SILVA, R. C. ; PIMENTEL, M. H. S. S. ; SANTOS, I. A. ; MAIA, C. H. ; SOUZA, G. G. O. . Maldita DP: Hoje eu amanhã você!. 2015 (Apresentação Musical).
3. **SOUZA, C. O.**; MESQUITA, D. B. ; SANTOS, I. A. ; MAIA, C. H. ; PIMENTEL, M. H. S. S. ; SILVA, R. C. ; PENTEADO, L. C. ; MARTINS, M. D. . Maldita DP Apresenta: 'Bendita seja a música'. 2015 (Show).

PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO

Graduação

1. BATISTELLA FILHO, F., **SOUZA, C.O.**, VIEIRA, L. Participação em banca de Gabriela Fortunato de Moraes. Uso de resíduo agroindustrial para a produção de mudas arbóreas. 2023. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis) – Instituto Federal de São Paulo - IFSP.
2. SANCHES, S. M., **SOUZA, C. O.**, Participação em banca de Mateus da Costa Silva. 2023. Defesa de Estágio (Tecnologia em Processos Químicos) – Instituto Federal do Triângulo Mineiro – IFTM.
3. RAMOS, L., **SOUZA, C. O.**; Participação em banca de ANA JANAINA MIGUEL DO NASCIMENTO. A Intervenção Neuropsicopedagógica no Processo de Aprendizagem de crianças portadoras do transtorno do espectro autista (TEA). 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Pedagogia) - Universidade Virtual do Estado de São Paulo.

4. MACHADO, L. P.; **SOUZA, C. O.**; SANTOS-FILHO, N. A. Participação em banca de Camila Mancio Moraes. Efeito do extrato de macroalgas na germinação e desenvolvimento do maracujá amarelo azedo - *Passiflora edulis Sims F. Flavicarpa*. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
5. GASPAROTO, M. C. G.; MAKINO, L. C.; **SOUZA, C.O.** Participação em banca de Jéssica Leocadio Pereira da Silva. ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ORIUNDOS DE TECIDOS FOLIARES DE BANANEIRA (*Musa spp.*). 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
6. SANTIAGO, P. S.; **SOUZA, C. O.**; MORGANTE, P. G. Participação em banca de Raphael de Araújo Campos. Interação da hemoglobina gigante de *Amynthes gracilis* com metais pesados. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE COMISSÕES JULGADORAS

1. Avaliador do XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP/2020

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. V dia do químico - Química e Sustentabilidade. 2022. (Seminário)
2. III Semana da Engenharia de Alimentos. 2020. (Seminário).
3. XLIV Congress of the Brazilian Biophysical Society - SBBf. 2019. (Congresso).
4. 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. 2018. (Congresso).
5. 46ª Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq. 2017. (Encontro).
6. 7º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia. 2016. (Congresso).
7. XXVIII Congresso de Iniciação Científica - Unesp. 2016. (Congresso).
8. 3ª Conferência Municipal da Juventude. 2015. (Outra).
9. II Congresso de Extensão e II Mostra de Arte e Cultura. 2015. (Congresso).
10. III Fórum Mundial de Educação Profissional e Tecnológica. 2015. (Congresso).
11. II Semana de Tecnologia em Alimentos. II SETECALIM. 2015. (Outra).
12. X Congresso sobre Geração Distribuída e Energia no Meio Rural. 2015. (Congresso).
13. Congresso de Iniciação Científica do IFSP. 2014. (Congresso).
14. Feira Internacional de Embalagens, Processos e Logística. 2014. (Feira).
15. I Congresso de Extensão e I Mostra de Arte e Cultura do IFSP. Apresentação de banda. 2014. (Congresso).
16. II Jornada de Ciência e Tecnologia do IFSP Campus Matão. 2014. (Outra).
17. X Encontro Brasileiro de Adsorção. 2014. (Encontro).
18. Congresso de Iniciação Científica do IFSP. 2013. (Congresso).
19. Feira Internacional de Tecnologia Agrícola em Ação. 2013. (Feira).
20. Feira Internacional de Tecnologia Sucroenergética. 2013. (Feira).
21. Jornada de Ciência e Tecnologia IFSP Campus Matão. 2013. (Feira).

22. Os desafios da invenção e da inovação no Brasil. 2013. (Simpósio).
23. Semana Nacional de Tecnologia IFSP Campus Matão. 2012. (Feira).

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

1. V dia do químico - Química e Sustentabilidade. 2022.
2. Jogos Universitários Matão. 2015.
3. I Semana da Consciência Negra do Campus Matão. 2014.
4. I Jornada de Ciência e Tecnologia IFSP Campus Matão. 2013.

ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES

Supervisão científica

- Raphael de Araújo Campos. Interação da hemoglobina extracelular gigante de *Amyntas gracilis* com metais pesados. 2018. (Graduando em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Raissa de Araújo Ramos. Imobilização da Hemoglobina de *Amyntas gracilis* (HbAg) em Polietilenoimina (PEI) Visando a Elaboração de Biossensores de Contaminação Ambiental. 2019. (Graduanda em Engenharia Agrônômica) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Nicholas Tôrres de Castro Borges. Desenvolvimento de cerveja artesanal sem álcool adicionada de castanha de baru. 2023. (Discente do curso técnico integrado em Química) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, IFTM.

CONCURSOS E PROCESSOS SELETIVOS

- Aprovado em concurso público para cargo efetivo de técnico de laboratório de química do IFPR – 40 horas. 2020.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família por sempre me apoiar, em especial aos meus pais e irmãos. Alzeni, Ademir, João Vitor e Adrielly. Família é tudo.

À minha irmã que, lá do céu, cuida, nos guia e dá forças para lutar.

À Deus e todos os intercessores.

À vida de todos os entes queridos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus. Não só pela vida, mas também pelo mundo maravilhoso criado para todas as criaturas vivas. Agraciá-lo é um dever.

À minha família, em especial aos meus pais Alzeni e Ademir pelo apoio incondicional e aos meus irmãos João Vitor e Adrielly por toda vida compartilhada. Aos meus primos, tios e avós. Amo vocês!

À minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Soares Santiago por todo apoio, amizade, ajuda e paciência.

À Dra. Valquíria da Cruz Rodrigues Barioto pela supervisão, discussão e todo apoio em São Carlos. Agradeço também à Dra. Juliana Soares Coatrini e ao Dr. Andrey Soares Coatrini pelas discussões e ensinamentos no IFSC.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior pela oportunidade da realização de parte da pesquisa em seu laboratório no IFSC-USP.

À Camila que esteve comigo em todos os momentos, dialogando, discutindo e dando força mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos de laboratório Lierge, Isis, Raphael, Jonathan, Raissa, Camilinha e todos os outros que passaram pelo biomoléculas e compartilharam do seu tempo e conhecimento.

Aos amigos que fiz em Registro e na UNESP Registro, aos professores que sempre mantive grande estima, aos técnicos, em especial à Liz que compartilhava momentos de descontração nos cafés do biomoléculas.

Agradeço também aos meus amigos e colegas de São Carlos, em especial a Sthefanny que me acolheu na república e se tornou uma amiga.

Aos meus amigos do IFPR e da pensão da Isolde, minha passagem por lá foi curta, mas muito marcante.

Aos meus amigos de Vinhedo que sempre me dão forças, em especial à Letícia, Maria e Camilla, vocês são especiais.

Aos meus amigos da República Etanóis. Mesmo separados, seguimos juntos!

Aos meus companheiros de trabalho do IFTM Ituiutaba que me acolheram muito bem, sou grato a cada um de vocês.

Aos servidores da STPG do IQ/Unesp de Araraquara que sempre são prestativos e solícitos, meu muito obrigado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho e na minha vida, seja direta ou indiretamente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código 001.

“Ano passado eu morri, mas esse ano eu não morro”

(Belchior)

RESUMO

Diversos estudos com enzimas e até mesmo hemoproteínas tem mostrado um grande avanço na fabricação de biossensores para monitorar e quantificar moléculas em diferentes meios. Dentre as hemoproteínas, as hemoglobinas gigantes são uma classe que detém características muito interessantes para o uso neste tipo de ferramenta biotecnológica, como é o caso do biossensoriamento de metais pesados. No presente trabalho, foi verificada a interação da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) com os metais cobre, cádmio e zinco, visando um protótipo de biossensor de metais pesados. Os ensaios biofísicos em solução da HbAg frente aos metais cobre, cádmio e zinco foram monitorados através de diversas técnicas espectroscópicas. A imobilização da HbAg foi realizada através da técnica de *Layer-by-Layer* (LBL) com o auxílio do polímero polietilenoimina (PEI) em quartzo para observar as mudanças espectrais no UV-Vis, e em eletrodo de carbono vítreo, para avaliação das alterações eletroquímicas da HbAg frente a adição dos metais. Além disso, a morfologia dos filmes também foi verificada com microscopia eletrônica de varredura e microbalança de cristal de quartzo. Verificou-se que a HbAg não se oxida na presença de cádmio e, frente ao zinco, a oxidação parcial é visualizada acima de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, além disso, nesta concentração, a hemoglobina sofre dissociação e agregação. A partir de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cobre em pH 7,0 a HbAg é oxidada, dissocia-se e perde parte de sua estrutura secundária. Em pH 5,0, sofre maior oxidação. Foi observado que o processo de imobilização não altera as propriedades óticas da hemoproteína e que, a partir da interação de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ do metal cobre sobre as bicamadas PEI/HbAg por 8 minutos, há um significativo deslocamento da banda de Soret, deslocando o máximo da banda de Soret para 409 nm na concentração de $70 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ademais, a interação do eletrodo contendo PEI/HbAg com cobre, cádmio e zinco, monitorados por voltametria cíclica, mostraram curvas semelhantes entre si com saturação do eletrodo em torno de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos metais. Um estudo comparativo entre a HbAg e a hemoglobina humana (HHb) imobilizada no quartzo foi realizado com o intuito de verificar se a detecção com a HbAg seria melhor monitorada quando comparada com a HHb. Porém, não foram observadas alterações significativas entre os dois sistemas. Todavia, através dos estudos óticos foi possível propor que a HbAg é sensível ao cobre e zinco nas concentrações analisadas em solução e desta forma a potencialidade da HbAg como sensor ótico foi verificada. Não há seletividade da molécula quando utilizada em sensor eletroanalítico nas condições analisadas.

Palavras-chave: Hemoglobina extracelular; biossensor ótico; metais pesados; voltametria cíclica.

ABSTRACT

Several studies with enzymes and even hemoproteins have shown great advances in the manufacture of biosensors for monitoring and quantifying molecules in different media. Among the hemoproteins, giant hemoglobins are a class that possesses very interesting characteristics for use in this type of biotechnological tools, such as the biosensing of heavy metals. In this study, the interaction of HbAg with the metals copper, cadmium, and zinc was examined, with the aim of developing a prototype biosensor for heavy metals. The biophysical assays of HbAg in solution with copper, cadmium, and zinc metals were monitored using various spectroscopic techniques. The immobilization of HbAg was performed using the Layer-by-Layer (LbL) technique, with the assistance of the polyethyleneimine polymer (PEI), on quartz to observe UV-Vis spectral changes and on a glassy carbon electrode to evaluate the electrochemical changes of HbAg upon the addition of metals. Additionally, the morphology of the films was also examined using scanning electron microscopy and quartz crystal microbalance. It was found that HbAg does not oxidize in the presence of cadmium, while in the presence of zinc, partial oxidation is observed at concentrations above $20 \mu\text{mol L}^{-1}$; moreover, at this concentration, hemoglobin undergoes dissociation and aggregation. At $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ of copper and pH 7.0, HbAg is oxidized, dissociates, and loses part of its secondary structure. At pH 5.0, it undergoes further oxidation. It was observed that the immobilization process does not alter the optical properties of the hemoprotein and that, starting from the interaction of $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ of copper with the PEI/HbAg bilayers for 8 minutes, there is a significant shift of the Soret band towards 409 nm at a concentration of $70 \mu\text{mol L}^{-1}$. Furthermore, the interaction of the PEI/HbAg-containing electrode with copper, cadmium, and zinc, monitored by cyclic voltammetry, showed similar curves with electrode saturation occurring at around $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ of the metals. A comparative study between HbAg and human hemoglobin (HHb) immobilized on quartz was performed to investigate if HbAg would provide better detection capabilities compared to HHb. However, no significant differences were observed between the two systems. Nevertheless, the optical studies suggest that HbAg is sensitive to copper and zinc at the analyzed concentrations in solution, thereby proving the potential of HbAg as an optical sensor. However, there is no selectivity of the molecule when used in an electroanalytical sensor under the analyzed conditions.

Keywords: Extracellular hemoglobin; optical biosensor; heavy metals; cyclic voltammetry.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação gráfica da estrutura da deoxy-Hb humana.	26
Figura 2. Esquema geral da organização do complexo proteico HbAg.	29
Figura 3. Ilustração esquemática da técnica de Layer-by-Layer (LBL).....	35
Figura 4. Esquema do diagrama dos níveis de energia da molécula.	36
Figura 5. Diagrama de Jablonski.	38
Figura 6. Exemplo hipotético de um voltamograma.....	41
Figura 7. Representação do microscópio eletrônico de varredura (MEV).	43
Figura 8. Exemplo esquemático da microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ).	45
Figura 9. Cromatograma da purificação da HbAg 30 mg.mL ⁻¹	48
Figura 10. Espectros de absorção da HbAg íntegra.	54
Figura 11. Espectros de absorção óptica da HbAg.	55
Figura 12. Espectros de emissão de fluorescência da HbAg	57
Figura 13. Áreas dos espectros de emissão em função da concentração de ZnSO ₄ em pH 7,0.....	58
Figura 14. Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg em função da concentração de ZnSO ₄	59
Figura 15. Espectroscopia da HHb frente ao sulfato de zinco.	60
Figura 16. Espectros de absorção óptica da HbAg antes e após a liofilização	60
Figura 17. Espectros de Absorção óptica da HbAg interagida com CdCl ₂ sem centrifugação.....	62
Figura 18. Espectros de Absorção óptica da HbAg interagida com c de CdCl ₂ com centrifugação.....	63
Figura 19. Espectros de emissão de fluorescência da HbAg em função da concentração de CdCl ₂	64
Figura 20. Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg em função da concentração de CdCl ₂	64
Figura 21. Espectroscopia das amostras de HHb com cádmio.	66
Figura 22. Eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% da HbGp e HbAg na ausência de β-mercaptoetanol.	67
Figura 23. Eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% da HbGp e HbAg na presença de β-mercaptoetanol.	67
Figura 24. Apresentação da bicamada PEI/HbAg.	69
Figura 25. Deslocamento do λ máximo das bandas de Soret das bicamadas PEI/HbAg.....	71
Figura 26. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) do Eletrodo com 1 bicamada de deposição do polímero PEI com a HbAg.....	73
Figura 27. Imagem da deposição de 10 camadas do polímero PEI	74
Figura 28. Imagem da deposição de 10 bicamadas PEI/HbAg).	74
Figura 29. Imagens das interações dos metais com a os eletrodos com 50 mil vezes de ampliação.	75
Figura 30. Imagens das interações dos metais com a os eletrodos com 100 mil vezes de ampliação.....	76
Figura 31. Variação da frequência de ressonância na superfície do eletrodo de ouro da microbalança.	76

Figura 32 Voltamograma da bicamada PEI/HbAg.....	78
Figura 33. Voltamogramas das interações de cobre, cádmio e zinco com as bicamadas PEI/HbAg e PEI/PVS	79
Figura 34. Módulos das áreas normalizadas dos voltamogramas das interações de cobre, cádmio e zinco com as bicamadas PEI/HbAg e PEI/PVS.	80
Figura 35. Módulos das áreas normalizadas dos voltamogramas das interações de cobre, cádmio e zinco com as bicamadas PEI/HHb, PEI/HbAg e PEI/PVS em concentrações crescentes dos metais (0 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	81
Figura 36. Impedância eletroquímica das 10 bicamadas de PEI/HbAg na ausência e presença de concentrações crescentes de CuSO_4	82
Figura 37. Impedância eletroquímica das 10 bicamadas de PEI/HbAg na ausência e presença de concentrações crescentes de CdCl_2	83

Lista de abreviaturas e siglas

CTAC – do inglês *cetyltrimethylammonium chloride* (cloreto de cetiltrimetil amônio)

DLS – do inglês *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento de Luz Dinâmico)

DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

HbAg – Hemoglobina de *Amyntas gracilis*

HbGp - Hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*

HbLt – Hemoglobina de *Lumbricus terrestris*

Hbs ou Hb - hemoglobinas

Hcs ou Hc – hemocianinas

HHb – Hemoglobina humana

Hrs ou Hr - Hemeritinas

kDa – kiloDalton

LFIA - do inglês *Lateral flow immunoassays* (imunoensaios de fluxo lateral)

LMCT – do inglês *ligand-to-metal charge-transfer* (banda de transferência de carga ligante-metal)

LSI – do inglês *Light scattering intensity* (Intensidade de Espalhamento de Luz)

MALDI TOF-MS – do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (Espectômetro de massa acoplado a Ionização e dessorção a laser assistida por matriz)

MECQ – Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo

MM – Massa molecular

PEI - Polietilenoimina

Phe – Fenilalanina

pI – Ponto isoelétrico

PVS - Poli(vinil sulfato de sódio)

SDS – do inglês *sodium dodecyl sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

Uv-vis – Ultravioleta e visível

λ – Comprimento de onda

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

Sumário

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Proteínas	24
2.2 Pigmentos respiratórios (hemoproteínas): Hemoglobinas, Hemocianinas e Hemeritinas	24
2.3 Anelídeos e hemoglobinas extracelulares	27
2.4 Interação de agentes caotrópicos com as hemoglobinas extracelulares	30
2.5 Sistemas de detecção de moléculas: Testes rápidos e biossensores	31
2.6 Técnicas Analíticas empregadas	35
2.6.1 Absorção ótica (UV-Vis)	35
2.6.2 Fluorescência no estado estacionário	37
2.6.3 Intensidade de espalhamento de luz (LSI)	38
2.6.4 Voltametria cíclica	39
2.6.5 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	41
2.6.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
2.6.7 Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ)	44
3 OBJETIVOS	47
3.1 GERAL	47
3.2 ESPECÍFICOS	47
4 METODOLOGIA	48
4.1 Extração e purificação da HbAg	48
4.2 Eletroforese SDS PAGE	49
4.3 Metodologia de análises de Espectroscopia Uv-Vis, fluorescência e intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg e da Hemoglobina humana (HHb).	49
4.4 Preparo dos filmes em quartzo	50
4.5 Análises voltamétricas	51
4.6 Caracterização dos filmes	51
4.6.1 MEV	51
4.6.2 Impedância Eletroquímica	52
4.6.3 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 PARTE A: Avaliação da HbAg como biossensor ótico de metais pesados	53

5.1.1 Interação da HbAg nativa com metais pesados: Estudos em solução	53
5.1.2 Estudos de interação da HbAg nativa com zinco (ZnSO ₄)	55
5.1.3 Estudos da interação da HbAg com cádmio (CdCl ₂).	61
5.1.4 Medidas de eletroforese monodimensional SDS-PAGE.....	66
5.1.5 HbAg aplicada como um sistema ótico de detecção de metais pesados.	68
5.2 PARTE B: Avaliação da HbAg como biossensor eletroanalítico de metais pesados	72
5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG)	72
5.2.2 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)	76
5.2.3 Voltametria cíclica das bicamadas de PEI/HbAg	77
5.2.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).....	81
6 CONCLUSÃO	84
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	86
8 REFERÊNCIAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

As minhocas são consideradas bons indicadores de contaminação ambiental, elas são frequentemente utilizadas como bioindicadores devido à sua sensibilidade a mudanças no ambiente. A presença de poluentes, como metais pesados e substâncias químicas tóxicas, podem afetar a sobrevivência, o comportamento e a reprodução das minhocas (SOARES; MARIANO; PAULINO, 2020; STEFFEN et al., 2013; YADAV et al., 2023).

As hemoglobinas destes animais diferem substancialmente quando comparadas com a Hb (Hemoglobina) da maioria dos vertebrados, apresentando uma massa molecular de aproximadamente 3 a 4 MDa em detrimento a apenas 64 kDa das encontradas nos seres humanos (OLIVEIRA et al., 2020; VOET; VOET, 2013). A hemoglobina humana é uma proteína presente nos glóbulos vermelhos do sangue (eritrócitos) que é responsável pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos do corpo. Já as hemoglobinas dos anelídeos não são comportadas dentro de células, sendo chamadas também de hemoglobinas extracelulares (BACHEGA et al., 2015; MOREIRA et al., 2011).

Agentes caotrópicos podem afetar estas hemoproteínas, causando agregação, dissociação e oxidação do ferro presente no grupo heme (BARROS et al., 2015; MARMO MOREIRA et al., 2006; RAMOS, 2017). Muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo estudam as propriedades biofísicas e bioquímicas destas moléculas a fim entender sua estrutura, buscando também o desenvolvimento de novos produtos, como substituto sanguíneos e biossensores (MUZZELO et al., 2018; ZIMMERMAN et al., 2017).

Baseando-se neste potencial redox das hemoglobinas, muitos trabalhos têm sido reportados utilizando estas moléculas na confecção de biossensores. Os biossensores baseados em hemoglobina podem ser usados para detectar uma variedade de analitos, como glicose, ácido úrico e peróxido de hidrogênio (DOS SANTOS PEREIRA et al., 2019; HAJIAN et al., 2016; SOUZA; MORAES; FERREIRA, 2013; WANG et al., 2014). O princípio de funcionamento desses biossensores é baseado na mudança de propriedades da hemoglobina quando ela se liga a um analito específico. Essa mudança pode ser detectada por meio de técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia de absorção UV-visível (DAMBORSKÝ; ŠVITEL; KATRLÍK, 2016), ou por meio de eletroquímica (NASCIMENTO et al., 2022), como a voltametria.

Desta forma, neste trabalho, as interações da hemoglobina do anelídeo *Amyntas gracilis* (HbAg) com os metais pesados cobre, cádmio e zinco são apresentadas buscando o desenvolvimento de um biossensor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas

Ao observarmos a vida presente na natureza, podemos notar estruturas que se complementam e se encaixam perfeitamente, formando novas formas e se adaptando ao meio ambiente. A formação das proteínas é um exemplo desse fenômeno, em que as cadeias de aminoácidos se doam em estruturas tridimensionais específicas, permitindo que interajam de forma precisa com outras moléculas (VOET; VOET, 2013).

As proteínas desempenham papéis centrais em quase todos os processos da vida conhecida, encontradas com inúmeras formas e funções, atuando em tarefas como catálise, transporte de moléculas, defesa, composição do tecido muscular, entre outros (NELSON e COX, 2006). São as mais abundantes e importantes macromoléculas dos organismos; ocorrem em praticamente todas as partes das células (VOET; VOET, 2013).

Observando mais de perto, nota-se que estas moléculas são formadas por polímeros de aminoácidos, ligados entre si por ligações covalentes, chamadas de ligações peptídicas. Estas são ligações químicas entre o grupo amino de um aminoácido e o grupo carboxila de outro aminoácido. Quando muitos aminoácidos são unidos, formam-se proteínas longas e complexas, a ordem e combinação destes aminoácidos determina a estrutura tridimensional da proteína e, conseqüentemente, sua função específica. As proteínas estão presentes desde a composição das bactérias até os complexos corpos humanos, são formadas por apenas 20 aminoácidos que compartilham de características estruturais comuns, diferenciando, na maioria dos casos, por sua cadeia lateral (NELSON; COX, 2012).

A vasta diversidade de moléculas que podem ser criadas a partir destas ligações peptídicas resultam na formação de proteínas com uma ampla gama de funções na vida dos seres vivos, incluindo o importante papel de transporte de oxigênio nos organismos.

2.2 Pigmentos respiratórios (hemoproteínas): Hemoglobinas, Hemocianinas e Hemeritinas

Durante a fase Pré-Cambriana, a elevação da concentração atmosférica de oxigênio atuou como um fator de pressão seletiva que impulsionou o surgimento dos pigmentos respiratórios. Acredita-se que esse evento tenha sido um marco importante

na evolução da vida na Terra (ALVAREZ-CARREÑO; BECERRA; LAZCANO, 2016). O aumento de tamanho dos corpos dos animais, a capacidade das proteínas carreadoras de oxigênio de resistir à auto oxidação e danos causados pelas espécies reativas de oxigênio, também contribuíram significativamente para o processo evolutivo (COATES, DECKER, 2017). A partir dessa evolução, os pigmentos respiratórios, também chamados de hemoproteínas, são classificados em três grandes grupos: as hemoglobinas (Hbs) tanto intracelulares como extracelulares, Hemeritrinas (Hrs) e hemocianinas (Hcs), estas últimas divididas entre Hc de moluscos e Hc de artrópodes (COATES; DECKER, 2017).

As Hcs são responsáveis pelo transporte de oxigênio no corpo do animal e contém algumas peculiaridades. Tanto as Hcs de artrópode quanto as de moluscos contêm um grupo di-cobre coordenado por resíduos de histidina, ligando-se de forma reversível com o oxigênio (VAN HOLDE; MILLER; DECKER, 2001). Esse centro di-cobre dá coloração azul à molécula, quando o cobre está coordenado com o oxigênio, numa configuração $[Cu(II) O_2^- Cu(II)]$, chamada também de forma oxi-Hc; por outro lado, quando não está ligada ao oxigênio, prevalece a forma desoxi-Hc, de coloração incolor, numa configuração $[Cu(I) Cu(I)] [Cu(I) Cu(I)]$ (SOLOMON; BALDWIN; LOWERY, 1992).

As Hcs encontradas em artrópodes e moluscos possuem uma função fisiológica similar, que é o transporte circulatório de oxigênio para os tecidos. No entanto, a arquitetura molecular dos agregados e o tamanho das unidades estruturais e funcionais são significativamente diferentes nas hemocianinas desses dois filos (STOEVA et al., 2001). Nas Hcs de moluscos, a estrutura quaternária básica é decamérica com subunidades idênticas, com pesos moleculares entre 4 e 9 MDa, formando um cilindro oco. Em contrapartida, as Hcs de artrópodes são hexaméricas ou múltiplas de hexâmetros, constituídas por subunidades estruturais de 75 kDa, aproximadamente, com formato que lembra um rim ou feijão (COATES; DECKER, 2017; STOEVA et al., 2001).

Estas proteínas demonstram muitas aplicações que podem ser associadas a processos fisiológicos e até de resposta imune em invertebrados. São estudadas como precursores de peptídeos antimicrobianos, aglutinadores de microrganismos patogênicos, além de atividade fenoloxidase (PO) induzível (RAMOS, 2022).

Com relação as hemeritrinas (Hrs), elas são proteínas relativamente raras, intracelulares e ocorrem em poucas espécies de vermes marinhos além de algumas

bactérias (COATES; DECKER, 2017). Apresentam dois átomos de ferro em sua estrutura, sem grupamento heme, são rosa-lilás quando complexadas com oxigênio e incolores quando livres (VOET; VOET, 2013). As Hrs podem estar dentro de eritrócitos ou tecidos musculares (COATES; DECKER, 2017; MANWELL, 1960).

Por fim, as hemoglobinas (Hbs) apresentam uma ampla variação estrutural, desde formas monoméricas até complexos gigantes, elas têm como função principal transportar oxigênio para os tecidos do corpo nos animais vertebrados e alguns invertebrados (VOET; VOET, 2013). Em humanos, estas moléculas estão contidas dentro de eritrócitos, denominados hemácias, garantindo grande estabilidade contra proteólise, baixa pressão osmótica e prevenindo perdas nos processos de filtração dos rins (COATES; DECKER, 2017). As Hbs de vertebrados são formadas por duas cadeias idênticas denominadas α e duas cadeias idênticas denominadas β , compondo então dois dímeros- $\alpha\beta$ ($\alpha_1\beta_1$ - $\alpha_2\beta_2$). Estes dois dímeros se rearranjam para formar o tetrâmero da hemoglobina, com massa de aproximadamente 64 kDa (COATES; DECKER, 2017; NELSON; COX, 2012). A Figura 1 apresenta a estrutura quaternária da hemoglobina descrita acima.

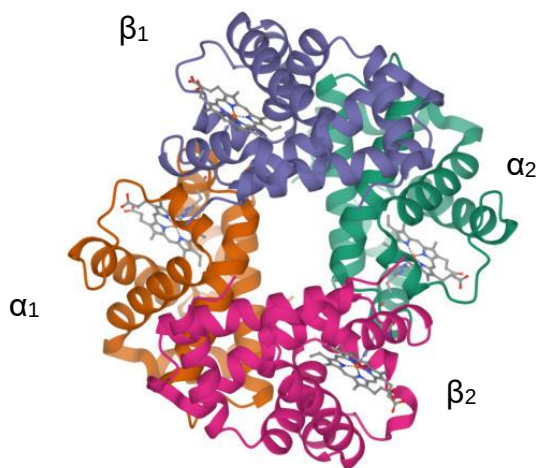


Figura 1. Representação gráfica da estrutura da deoxy-Hb humana. Estrutura da Hb humana (código PDB: 1A3N). Biomolécula tetrâmica formada por 2 cadeias α e duas cadeias β , além disso, há a presença de um anel porfirínico (grupo heme) em cada subunidade.

Fonte: Adaptado de (TAME; VALLONE, 2000).

Na estrutura de cada globina está contido um grupo prostético heme, que se liga a um resíduo de histidina presente na cadeia polipeptídica da globina e fica alojado na região central da proteína. O grupo heme é um complexo prostético composto por um átomo de ferro no centro, que se liga reversivelmente ao oxigênio, e uma estrutura porfirínica que envolve o ferro. É a presença do grupo heme que permite à

hemoglobina se ligar ao oxigênio e transportá-lo pelo sangue até os tecidos do corpo (NELSON; COX, 2012).

As hemoglobinas são moléculas complexas que empreendem funções vitais em muitos organismos, porém, há uma classe bem específica que detém características distintas das já citadas hemoglobinas intracelulares, chamadas hemoglobinas extracelulares ou eritrocruorinas.

2.3 Anelídeos e hemoglobinas extracelulares

Desempenhando um papel semelhante às Hbs intracelulares, as Hbs extracelulares são encontradas em alguns animais invertebrados, como os anelídeos.

Estes animais são de grande importância para o ambiente em que se encontram, porém, algumas práticas utilizadas pelos seres humanos afetam o uso, o manejo, a cobertura vegetal e as características físico-químicas e biológicas do solo e, com isso, alteram significativamente as populações das minhocas (MERLIM et al., 2005). Esses animais são considerados bons indicadores da qualidade de ecossistemas agrícolas, uma vez que são sensíveis a diferentes tipos de manejo e uso dos solos. Este comportamento é observado em áreas de derramamentos de metais pesados, pesticidas e outros compostos que afetam e/ou eliminam a atividade destes anelídeos nestes locais (ANDRÉA, 2010; SOARES; MARIANO; PAULINO, 2020; VAMPRÉ; FUCCILLO; ANDRÉA, 2010).

Muitas são as espécies de anelídeos encontrados ao redor do mundo, no Brasil as mais comuns são a *Pontoscolex corethrurus*, conhecida como “minhoca mansa”, a *Lumbricus terrestris* que é conhecida como “minhoca-da-terra” e há também algumas espécies popularmente conhecidas como “minhocuçu”, um exemplar bastante encontrado é o “minhocuçu-do-cerrado” (*Rhinodrilus alatus*) (BROWN; FRAGOSO, 2007). Além destes exemplares, também se destaca a espécie *Amyntas gracilis*, que é exótica no Brasil, de origem asiática, bastante encontrada em regiões frescas e/ou úmidas das regiões sul e sudeste do país (DE SILVA et al., 2010). Esta espécie tem como nome popular “puladeira havaiana”, “minhoca puladeira” ou “minhoca louca”, é bastante encontrada em áreas agrícolas no país.

As minhocas são animais do filo *Annelida* e da subclasse *Oligochaeta*. São animais com o corpo segmentado interna e externamente em diversos anéis (STEFFEN et al., 2013). Estes invertebrados detêm de um sistema circulatório distinto onde há vascularização dentro do corpo do indivíduo, desta forma, a evolução

possibilitou a presença de hemoglobinas extracelulares gigantes não comportadas dentro de eritrócitos, como é o caso da maioria dos vertebrados (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2018).

As hemoglobinas dos anelídeos, quando comparadas com a hemoglobina humana, diferenciam entre si em alguns aspectos. As hemoglobinas extracelulares podem ser caracterizadas como gigantes, pois possuem um alto peso molecular, em torno de 3 MDa (TABAK et al., 2012), diferentemente da hemoglobina humana que é intracelular e tem um peso molecular em torno de 64 kDa (VOET; VOET, 2013). As Hbs extracelulares possuem alta estabilidade oligomérica, resistência à oxidação, alta cooperatividade e alta afinidade para ligar-se ao oxigênio quando comparada à hemoglobina humana (TABAK et al., 2012). Além disso, alguns grupos de pesquisa têm utilizado-as em aplicações biomédicas como protótipo de sangue artificial e aditivo para prolongar a preservação de órgãos transplantados (ALIX et al., 2020; HARNOIS et al., 2009; POZY; SAVLA; PALMER, 2023; ROUSSELOT et al., 2006). Outra aplicação que pode ser interessante para as hemoglobinas extracelulares gigantes é a possível utilização como biossensor de poluentes ambientais (NASCIMENTO et al., 2022) como é o caso do presente trabalho.

A hemoglobina gigante do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (HbGp), proteína ortóloga à de *Amynthes gracilis* (HbAg), é uma hemoproteína que vem sendo estudada há mais de 30 anos (TABAK et al., 2012). A HbGp apresenta uma estrutura hexagonal, composta por uma bicamada onde cada camada contém 6 protômeros e cada protômero é constituído por 3 cadeias globínicas ligadas a 3 *linkers* $(abcd)_3L_3$, cada cadeia globínica (*a*, *b*, *c* e *d*) apresenta um grupo heme, totalizando 144 grupos hemes, além de 36 cadeias *linkers* (BACHEGA, 2013).

Em se tratando da hemoglobina de *Amynthes gracilis*, sua estrutura foi elucidada por SEBASTIÃO (2022), apresentando similaridade com a estrutura de HbGp citada acima. A unidade da estrutura de HbAg contém 180 cadeias das quais 144 são globinas e 36 são *linkers*. As globinas são arranjadas em dodecâmeros formando a estrutura denominada de cap $((abc)_3(d)_3)$, tais globinas (*abc*) se ligam através de ligações dissulfeto, ademais, o protômero de HbAg é formado com a união do cap ao heterotrímero de *linkers* $(L_1L_2L_3)$, formando uma monocamada com 6 protômeros que se sobrepõe e resultam numa bicamada hexagonal com 12 protômeros no total (SEBASTIÃO, 2022), o esquema da organização do complexo proteico da HbAg é mostrado na Figura 2.

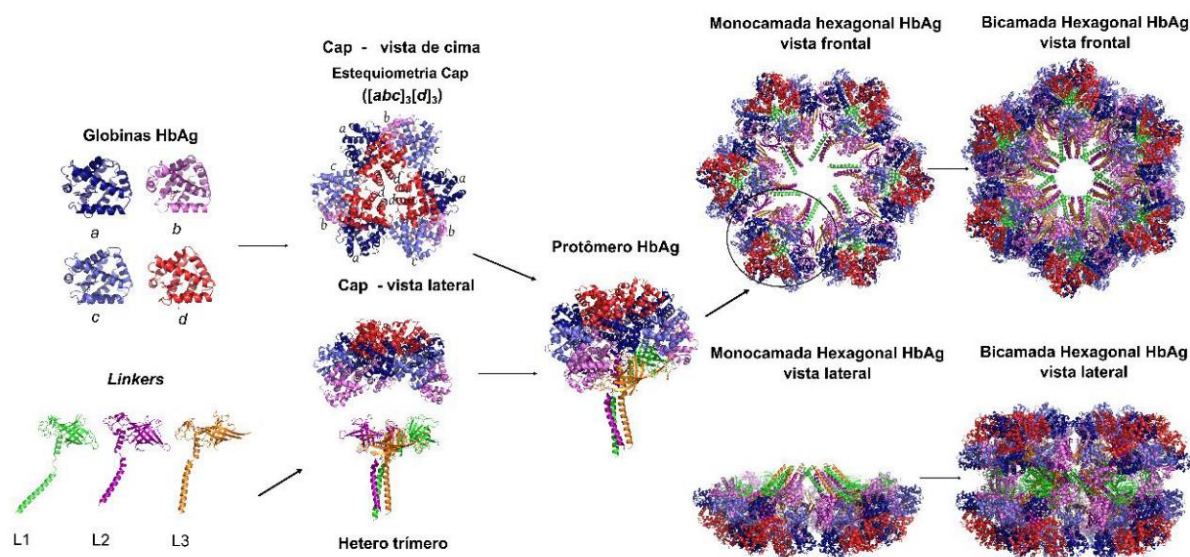


Figura 2. Esquema geral da organização do complexo proteico HbAg. Iniciando ao lado esquerdo da imagem tem-se a representação de todas as cadeias de HbAg; na parte superior foram desenhadas as globinas *a* (azul marinho), *b* (lilás), *c* (azul claro) e *d* (vermelho); e na parte inferior encontram-se os linkers *L1* (verde), *L2* (roxo) e *L3* (laranja). Na região central da figura encontra-se representado o protômero, ele é formado por um dodecâmero denominado de cap com estequiometria $[abc]_3[d]_3$ e um trímero de linkers. Seguindo na sequência da figura, do lado superior direito foram desenhadas a monocamada (arranjo de seis protômeros) e a bicamada hexagonal (arranjo de 12 protômeros) com vista frontal e lateral respectivamente.

Fonte: Sebastião, I. (2022)

As globinas da HbAg (*a*, *b*, *c* e *d*) apresentam massas moleculares em torno de 16 a 17 kDa, enquanto que os *linkers* variam de 28 a 30 kDa (OLIVEIRA et al., 2020; SEBASTIÃO, 2022), dados similares foram encontrados nas proteínas homólogas à HbAg como a HbGp e HbLt (BACHEGA et al., 2015; CARVALHO et al., 2011; ROYER; OMARTIAN; KNAPP, 2007). Além disso, neste mesmo trabalho de sequenciamento da HbAg, Sebastião (2022) verificou a expressão da hemeritina em *A. gracilis*, juntamente com a identificação das Hbs. A hemeritina é um pigmento respiratório que coexiste com as Hbs na espécie em questão. Ao contrário das Hbs, a hemeritina não possui o grupo Heme, mas sim um sítio ativo de ferro que pode se ligar a duas moléculas de oxigênio (SEBASTIÃO, 2022), em acordo com os achados de Costa-Paiva e Coates (2020), que sugerem a presença de genes de hemeritinas em todos os anelídeos.

Em diversos ensaios visando a caracterização experimental da HbAg, OLIVEIRA e colaboradores (2020), encontraram valores de massa das subunidades semelhantes aos descritos acima, além disso, observaram que em valores de pH neutros, a hemoglobina permanece estável até temperaturas próximas de 52°C, porém, um aumento no valor do pH (acima de 9,0) promove dissociação oligomérica parcial e há oxidação parcial da proteína. Em relação ao ponto isoelétrico, a HbAg

nativa apresenta um pI ácido definido em pH 6,1, já para sua subunidade α o pI estimado é de 7,1. Estes dados são corroborados pelos estudos de Sebastião (2022) citados acima, que estimou o pI das globinas entre 6,12 e 7,0 e dos *linkers* entre 4,86 e 6,24. Da mesma forma, os estudos biofísicos realizados por RAMOS (2017) da HbAg na ausência e presença dos surfactantes SDS e CTAC também nos fornecem dados importantes do comportamento desta hemoproteína frente à estes agentes caotrópicos. Nestes ensaios, a HbAg sofreu oxidação e dissociação pela ação dos surfactantes, tanto para valores de pH 7,0 quanto de 5,0.

2.4 Interação de agentes caotrópicos com as hemoglobinas extracelulares

Estudos de oxidação das Hbs frente aos agentes caotrópicos tem trazido informações relevantes sobre a estabilidade oligomérica desta classe de proteínas (BARROS et al., 2020; CARVALHO et al., 2013a; MUZZELO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020; POLI et al., 2006; RAMOS, 2017; ZIMMERMAN et al., 2017). A interação da hemoglobina nativa com agentes caotrópicos (como ureia, surfactantes e metais pesados) pode ocasionar sua oxidação, promovendo alterações no centro férrico do grupo heme. Carvalho e colaboradores (2013) utilizaram a ureia para provocar a oxidação e a desnaturação da HbGp e propor um modelo de dissociação/oxidação para esta hemoglobina. Poli e colaboradores (2006) estudaram a interação do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) com a HbGp com o intuito de verificar a cinética de oxidação da hemoproteína com este surfactante, assim como Ramos (2022) verificou oxidação e dissociação da HbAg frente aos surfactantes SDS e CTAC (Cloreto de Cetil Trimetil Amônio). Estudos relacionados com os efeitos oxidativos de metais pesados (como cádmio, cobre e mercúrio) e o aumento da massa molar da hemoglobina de *Lumbricus terrestris* (HbLt) expostas aos metais supracitados foram analisados por Calisi e colaboradores (2011). A formação de meta-hemoglobina (MetHb), para os autores, foi identificada com o aumento da exposição das minhocas aos metais, evidenciando a sensibilidade deste anelídeo aos metais presentes em solos contaminados. Além disso, alguns estudos indicam que as hemoglobinas derivadas de diferentes espécies de anelídeos podem servir como indicadores biológicos de contaminação ambiental, especialmente em relação a metais pesados. Pesquisas envolvendo o transcriptoma do poliqueta marinho

Ophelina sp.1 exposto a ambientes com altas concentrações de cobre revelaram um aumento na expressão dos transcritos das globinas do tipo b (NEAVE et al., 2012).

Resultados semelhantes foram observados no poliqueta *Alitta virens*, o qual foi exposto a concentrações variadas de cobre e zinco, e apresentaram um aumento na expressão de cadeias de globinas e *linkers* (GREEN ETXABE et al., 2021). Assim, os autores sugerem que as hemoglobinas produzidas a partir de genes induzidos como resposta a algum tipo de estresse podem apresentar resistência aos danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS), modificações na afinidade pelo oxigênio (O₂) ou conversão da hemoglobina em metahemoglobina. Tamás e colaboradores (2014) mostraram que metais pesados afetam profundamente a homeostase proteica e a viabilidade celular, causando agregação e desenovelamento de proteínas, seguido de oxidação e desnaturação destas proteínas frente aos metais pesados.

Estudos como os de McCombs e colaboradores (2017) verificaram que poluentes orgânicos persistentes (POPs) de classes azóis como benzotriazol, benzomidazol, indazol e imidazol podem perturbar as funções da hemoglobina do anelídeo *Amphitrite ornata*, induzindo alterações nos espectros de UV-Vis, deslocando o pico de absorção da banda Soret para valores de comprimento de onda (λ) e alargamento das bandas Q, formando espécies hexacoordenadas de spin baixo e evidenciando a oxidação da hemoglobina. Essas mudanças espectrais podem vir a ser mensuradas, assim como as encontradas na HbAg e, possivelmente utilizadas para detectar estes poluentes através de sistemas de detecção tais como os biossensores óticos.

2.5 Sistemas de detecção de moléculas: Testes rápidos e biossensores

Diversos exemplos de sistemas de detecção de moléculas são reportados na literatura com diferentes abordagens qualitativas e quantitativas. Dentre alguns exemplos de sistemas de detecção de moléculas, estão os testes rápidos de fluxo lateral (LFIA, do inglês “*Lateral flow immunoassays*”) enquanto entre os sistemas com processos mais complexos de fabricação e que podem demandar maiores tecnologias, destacam-se os sensores de gás, biossensores, imunossensores para detecção de proteínas, DNA e afins.

Vale mencionar que o uso de biomoléculas neste tipo de equipamento é cada vez maior e muitos deles já estão sendo comercializados para a população. Sistemas que detectam biomoléculas, como antígenos ou anticorpos, já são utilizados em

técnicas como as de fluxo lateral, conhecido também por testes imunocromatográficos (ENDO et al., 2008; XING et al., 2022), e movimentam grande parte dos testes e ensaios rápidos disponíveis no mundo atualmente. Estes testes funcionam, basicamente, pela migração por capilaridade da amostra (gota de sangue, saliva, urina, etc) por uma membrana. Esta amostra pode conter as moléculas biológicas (antígenos, anticorpos, hormônios) que o teste pode detectar. Se o objetivo do teste for detectar um antígeno, por exemplo, o seu par-conjugado que estará imobilizado na fita será um anticorpo que ligue a este antígeno. Este conjugado está previamente ligado à uma partícula que ajuda na identificação visual do resultado do teste, e que muitas vezes são usadas partículas de ouro imobilizadas para essa identificação visual (KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

Desta forma, quando a amostra é aplicada na fita do teste, ela migra através da membrana e interage com seu par-conjugado que está imobilizado, formando o complexo analito-conjugado. Este complexo segue fluindo pela membrana até encontrar uma proteína de captura imobilizada, esta proteína não deixa o complexo continuar fluindo e se liga a ele fazendo com que o mesmo fique preso, produzindo posteriormente um sinal visual (uma linha) que é observado pelo profissional que aplica o teste. Há também uma linha de controle que indica o bom funcionamento do processo. Se a amostra não contiver a molécula de interesse, apenas aparecerá a linha do controle para o observador. Além disso, uma solução tampão é aplicada junto da amostra para auxiliar a migração dos componentes além de promover a diluição da mesma (KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

A aplicação mais conhecida do ensaio de fluxo lateral é o teste de gravidez que é baseado na detecção de hCG (*human chorionic gonadotropin*) na urina (ANFOSSI et al., 2013). Além disso, hoje em dia, os testes de antígeno para a COVID-19 também são amplamente aplicados utilizando esta tecnologia (ADATI; RIBEIRO, 2021). Estudos identificando o vírus da dengue utilizando esta técnica também já foram reportados na literatura (AXELROD; ELTZOV; MARKS, 2020; KABIR et al., 2021). Estes trabalhos evidenciam que esta é uma abordagem muito utilizada para diagnósticos rápidos de algumas doenças.

Por outro lado, em linhas gerais, os biossensores são dispositivos mais complexos que utilizam moléculas biológicas no reconhecimento de moléculas orgânicas ou inorgânicas através de técnicas eletroquímicas, óticas, piezoelétricas ou calorimétricas (PUTZBACH; RONKAINEN, 2013; SINGH et al., 2021). Considerados

um subgrupo dos sensores químicos, desempenham um papel muito importante em laboratórios de análise clínica rápida (JUSTINO; DUARTE; ROCHA-SANTOS, 2016; SUMITHA; XAVIER, 2023), meio ambiente (NIGAM; SHUKLA, 2015; NNACHI et al., 2022; VAMVAKAKI; CHANIOTAKIS, 2007) e indústrias farmacêuticas (CICHA et al., 2022; GIL; DE MELO, 2010; LAGHLIMI et al., 2023) devido a sua alta sensibilidade e seletividade. Os recentes desenvolvimentos em tecnologia e ciência dos materiais vêm melhorando e otimizando os mais variados biossensores já desenvolvidos, impulsionando ainda mais a busca pelo aprimoramento destes equipamentos (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; SINGH et al., 2021).

Um biossensor fornece informações analíticas específicas, semi-quantitativas ou quantitativas sobre o analito de interesse, utilizando-se de um sistema de reconhecimento biológico que entra em contato com o elemento de transdução. O elemento transdutor pode ser eletroquímico (condutimétrico, amperométrico ou potenciométrico), com detectores de massa (relacionando oscilação de algum cristal piezoelétrico a uma variação de massa) ou ótico (análises por fluorescência, luminescência e absorção ótica). Já o sistema de reconhecimento biológico é composto por enzimas, tecidos vegetais e animais, microrganismos, antígeno/anticorpos, organelas, ácidos nucleicos, entre outros (DAMBORSKÝ; ŠVITEL; KATRLÍK, 2016; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; SOARES et al., 2019). De forma geral, a interação do elemento biológico receptor com o analito alvo através de reações específicas gera alterações no meio que são captadas e transformadas pelo conversor em um sinal mensurável, este sinal pode ser proporcional à concentração do analito, permitindo medições qualitativas e/ou quantitativas das amostras (SUMITHA; XAVIER, 2023).

Ademais, os biossensores óticos buscam detectar moléculas orgânicas e inorgânicas que possuem alguma atividade ótica ou que o resultado de sua ação (enzimática/química) produza estas moléculas, mensurando estas alterações que podem ser vistas a olho nu ou com o auxílio de fotodetector (DINCER et al., 2019). Em outras palavras, nessa subclasse de biossensores, a reação entre o analito estudado e o receptor biológico produz ou absorve luz que pode ser detectada por tubos fotomultiplicadores, como é o caso das fibras óticas. Estes biossensores são amplamente utilizados para a detecção de substâncias tóxicas, agentes patogênicos, contaminantes em alimentos e no meio ambiente (UNIYAL et al., 2023; BARROCAS et al., 2008; NAZARETH et al., 2021).

Xavier e colaboradores (2000) utilizaram um biossensor de fibra ótica para detecção de dois pesticidas, propoxur e carbaril, da classe carbamato, ambos extensivamente usados em produção de hortaliças como cebolas e alfaces. Os pesquisadores verificaram que na presença de acetilcolina (formada pela interação da acetilcolinesterase com os pesticidas) a cor da camada sensível ao pH altera e o sinal de refletância é relacionado a concentração de carbamato. Em outro estudo, um biossensor ótico em tiras foi desenvolvido por MUSLIM e colaboradores (2012) para determinar o L-glutamato em amostras de sopas, molhos e comidas processadas. Os autores utilizaram membranas de nafion/sol-gel e quitosana empilhadas que, ao serem imersas na solução contendo o analito, exibem uma transição de cor gradual, do verde claro ao verde escuro, correspondente ao aumento da concentração de L-glutamato, apresentando um limite de detecção de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Já com o intuito de criar um biossensor ótico para detectar bilirrubina, ELLAIRAJA e colaboradores (2017) utilizaram a técnica de UV-Vis para detectar seletivamente a bilirrubina colorimetricamente.

Atualmente existem uma infinidade de técnicas para elaboração e montagem deste tipo de sensor. Uma técnica muito utilizada para a fixação de moléculas nestes biossensores é a técnica de LBL (do inglês "*Layer-by-Layer*") que é composta de várias camadas sobrepostas, alternando as moléculas de interesse a serem fixadas com uma matriz de carga oposta, se ligando assim por forças eletrostáticas. Essa bicamada é depositada sobre um substrato sólido e inerte que pode ser vidro, quartzo, carbono, mica ou outra superfície sólida inerte. Um dos trabalhos pioneiros sobre esse tipo de montagem de filme com controle da espessura e arquitetura molecular é o de Lvov e colaboradores (1995), onde ressaltam a vantagem da técnica em preservar a atividade da proteína nas condições de fabricação dos filmes. A Figura 3 exemplifica a interação das camadas na técnica de LBL.

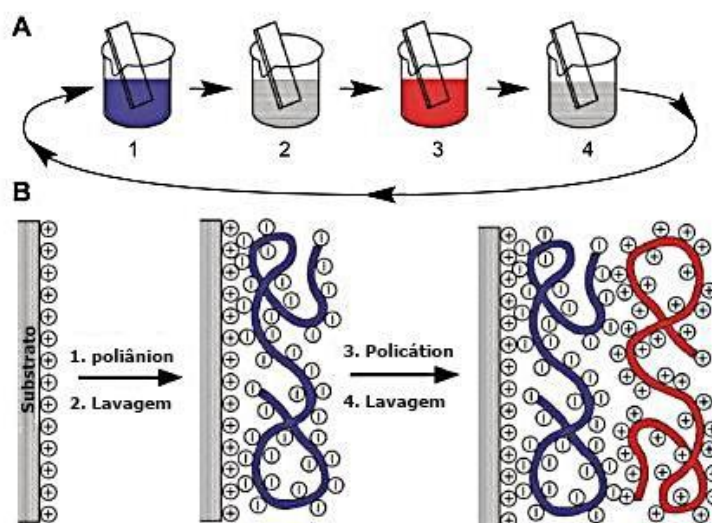


Figura 3. Ilustração esquemática da técnica de Layer-by-Layer (LBL). (A) Representação ilustrativa da deposição dos polieletrólitos no substrato sólido. Parte 1 e 2 mostram a adsorção do poliânion enquanto 3 e 4 a do policátion. (B) Esquema básico da interação molecular na adsorção dos polieletrólitos.

Fonte: Adaptado de (DECHER, 1997).

Esta técnica foi amplamente difundida por Decher em diversos estudos realizados na década de 1990, é uma abordagem alternativa à técnica de Langmuir-Blodgett (LB) para a fabricação de filmes nanoestruturados (RÓZ et al., 2015). Na literatura, biossensores utilizando a técnica de LBL para imobilização de outras globinas como hemoglobinas e mioglobinas foram amplamente reportados (GILLES-GONZALEZ et al., 1994; HAJIAN et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2022; SILVEIRA, 2012; SOUZA; MORAES; FERREIRA, 2013).

2.6 Técnicas Analíticas empregadas

2.6.1 Absorção ótica (UV-Vis)

A absorção ótica é uma técnica amplamente empregada para monitorar processos físicos e químicos de moléculas. Durante a incidência de luz, as moléculas da matéria absorvem uma parte dessa radiação, resultando na excitação de elétrons que transitam do estado fundamental para níveis de energia mais elevados.

Ao passar por um prisma, a radiação residual do material resultará na formação de um espectro de absorção. A absorção de energia por átomos ou moléculas causa a transição de estados de energia, indo de um estado de energia mais baixo (estado fundamental) para um estado de energia mais elevado (estado excitado). Na espectroscopia UV-Vis, que abrange a faixa de absorção de luz entre 190 e 800 nm, as transições de energia são de natureza eletrônica. Assim, a absorção de energia

por uma molécula provoca a transição de um elétron de um orbital ocupado para um orbital de energia potencial mais alto (PAVIA et al., 2010).

Esta técnica é baseada na análise da relação entre a radiação incidente (luz inicial) e a radiação transmitida (luz final) por uma amostra, geralmente diluída. Essa medida de absorção é regida pela lei de Beer-Lambert, que estabelece uma relação entre a quantidade de luz absorvida e o caminho óptico percorrido pela amostra em solução, considerando sua espessura. É expressa pela razão I_0 / I , que resulta no valor da fração da luz incidente que é transmitida (transmitância, também representada pela letra T), e os dados geralmente são expressos na forma de absorbância (Abs) pela seguinte equação:

$$T = I / I_0 \rightarrow A = \log T = (I_0 / I) = \varepsilon \times C \times \ell \quad (\text{Equação 1})$$

Em que A é o valor da absorbância, ε corresponde a absortividade molar, que é característico de cada espécie em um determinado solvente, C é a concentração da amostra e ℓ o caminho ótico da cubeta (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007; VOET; VOET, 2013). Desta forma, os elétrons absorvem uma quantidade de energia da radiação aplicada e deslocam-se para níveis de energia mais altos, conforme ilustra a Figura 4.

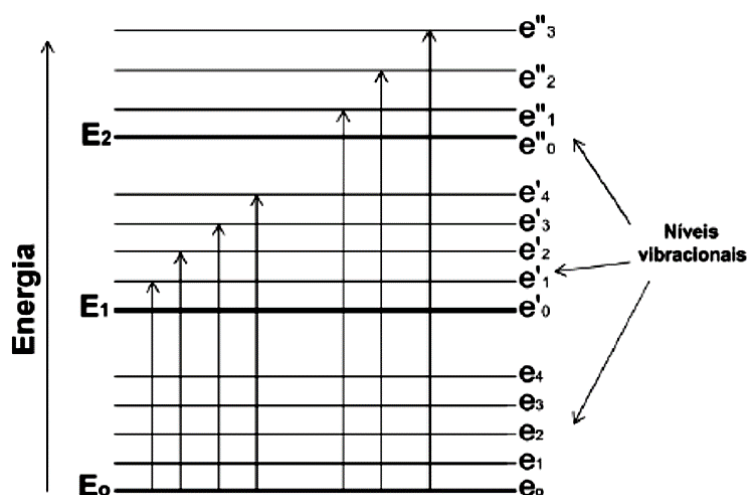


Figura 4. Esquema ilustrado do diagrama dos níveis de energia eletrônicos de uma molécula. E_0 é o nível de energia em seu estado fundamental, E_1 e E_2 são níveis dos estados de excitação, enquanto as linhas e_0 , e_1 , e_2 , e_3 , e e_4 representam os níveis vibracionais de energia da molécula.

Fonte: Adaptado de Skoog (2007)

Os comprimentos de onda dos máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) são parâmetros fundamentais na técnica espectroscópica. Eles indicam a diferença de energia entre

os níveis de transição, além disso, a largura da banda de absorção está relacionada com o ambiente ao redor do cromóforo, incluindo a heterogeneidade do cromóforo e o movimento molecular.

2.6.2 Fluorescência no estado estacionário

A técnica de fluorescência é amplamente empregada na biotecnologia, sendo aplicada em diagnósticos médicos, sequenciamento de DNA, análises genéticas e estudos biofísicos de proteínas (LAKOWICZ, 2006). A fluorescência é um tipo de fenômeno de luminescência, onde a emissão de luz por uma substância ocorre após a excitação de seus estados eletrônicos. Durante a fluorescência, os elétrons estão emparelhados no estado excitado singleto, ou seja, os *spins* dos elétrons ocupam orbitais de energia mais baixa e mais alta em direções antiparalelas, e, quando retornam ao seu estado fundamental, há a emissão de um fóton. Duas características fundamentais da fluorescência que são relevantes para a compreensão e aplicação dessa técnica são o rendimento quântico e o tempo de vida. O rendimento quântico refere-se à proporção de fótons emitidos em relação ao número de fótons absorvidos. O tempo de vida está relacionado ao tempo que o fluoróforo permanece no estado excitado, durante o qual pode interagir ou se difundir no ambiente em que se encontra. Existem diversas medições de fluorescência que podem ser realizadas por meio de equipamentos especializados, as quais podem ser classificadas em fluorescência estática (ou fluorescência medida no estado estacionário) ou fluorescência resolvida no tempo. As medições de fluorescência resolvidas no tempo exigem equipamentos mais avançados, uma vez que envolvem escalas de tempo muito curtas e o uso de fonte de luz mais específicas (LAKOWICZ, 2006; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

A molécula em estado excitado possui um tempo de vida relativamente curto, da ordem de 10^{-9} segundos, durante o qual parte da energia absorvida pode ser dissipada para o meio ou a fluorescência pode ser suprimida devido a fenômenos como movimentos vibracionais, rotacionais, entre outros. A luminescência molecular é classificada em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. Se o estado excitado for singleto, onde o *spin* do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, ocorre a fluorescência, conforme ilustrado no diagrama de Jablonski, contido na Figura 5 (LAKOWICZ, 2006; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

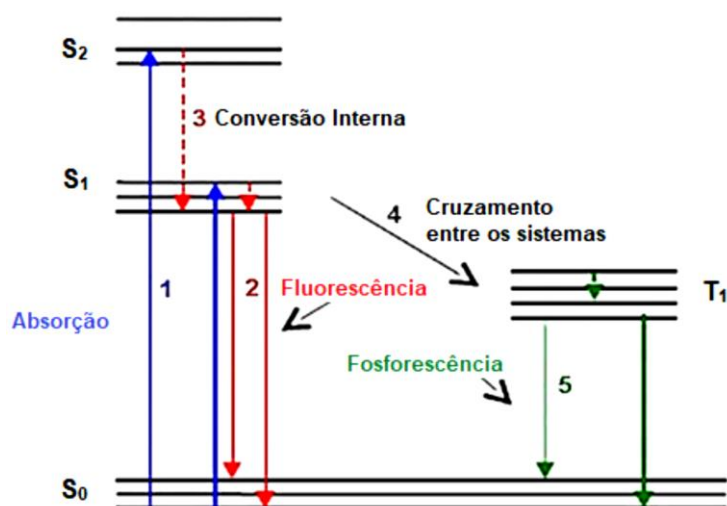


Figura 5. Diagrama de Jablonski. Onde 1 apresenta a absorção da radiação ($S_0 \rightarrow S_1$), onde está indicado com o número 2 ilustra a emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$), já o número 3 indica conversão interna e relaxamento vibracional ($S_2 \rightarrow S_1$), 4 mostra o cruzamento entre os sistemas ($S_1 \rightarrow T_1$) e 5 a emissão de fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0$).

Fonte: Adaptado de Lakowitz (2006).

Embora muitas moléculas possam interagir com radiação eletromagnética, absorvendo fótons de luz, apenas um pequeno número delas exibem fluorescência. Quando a diferença de energia entre o primeiro estado singlete excitado (S_1) e o estado fundamental (S_0) é pequena e há possibilidade de sobreposição de níveis vibracionais, a molécula pode retornar ao estado fundamental (S_0) por relaxamento vibracional sem emissão de radiação eletromagnética. No entanto, quando a diferença energética entre os dois estados (S_1 e S_0) é moderadamente grande, a desativação para o estado fundamental ocorre com emissão de radiação na forma de fluorescência (LAKOWICZ, 2006; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

2.6.3 Intensidade de espalhamento de luz (LSI)

A interação da radiação eletromagnética com a matéria pode resultar em vários efeitos, como absorção, emissão, transmissão ou espalhamento. O espalhamento de luz ocorre quando o campo elétrico oscilante da radiação incidente induz oscilações periódicas na nuvem eletrônica de um átomo, fazendo com que ele funcione como uma fonte secundária de radiação. As partículas carregadas são aceleradas pelo campo elétrico da luz incidente, levando-as a emitir radiação com a mesma frequência de onda da radiação incidente, resultando assim no espalhamento de luz (HOLDE; JOHNSON; HO, 2006).

É importante ressaltar que no espalhamento de luz não ocorre perda de energia, e as moléculas se movem perpendicularmente à sua aceleração. Além disso, a radiação emitida será polarizada na direção observada. Com base nessas características, é possível utilizar o espalhamento de luz para estudar a interação da hemoglobina com diferentes ligantes e avaliar processos de dissociação ou agregação da proteína na presença de agentes caotrópicos. Vale destacar que a intensidade do espalhamento de luz é diretamente proporcional ao quadrado do volume da partícula, o que permite o uso do espalhamento de luz como uma técnica sensível para investigar essas interações (OLIVEIRA et al., 2020; POLI, 2006; SANTIAGO et al., 2007).

2.6.4 Voltametria cíclica

As técnicas voltamétricas, desenvolvidas originalmente por Jaroslav Heyrovsky, têm sido amplamente estudadas em sistemas que envolvem mercúrio, com aplicação na investigação de processos envolvendo íons metálicos em soluções (PACHECO et al., 2013). As técnicas voltamétricas têm evoluído ao longo do tempo, recebendo contribuições de diversas áreas, como eletrônica, engenharia de materiais e outras. Essas contribuições têm tornado a técnica mais acessível em termos de custo, além de possibilitar a miniaturização de equipamentos, tornando-os mais portáteis e de fácil manuseio. Como resultado, as técnicas voltamétricas têm se mostrado uma alternativa viável para diversas aplicações na química analítica (PACHECO et al., 2013; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

Os métodos eletroanalíticos são baseados em propriedades elétricas mensuráveis, como corrente elétrica, diferenças de potencial e acúmulo de cargas, que surgem a partir de fenômenos nos quais uma espécie redox interage fisicamente e/ou quimicamente com outros componentes do meio. Essas medidas, conhecidas como sinais eletroquímicos, estão relacionadas com parâmetros químicos característicos de cada espécie analisada (WANG, 2000).

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre o eletrodo de trabalho e a fina camada de solução que está em contato com o eletrodo. É uma técnica dinâmica, pois a célula é operada na presença de corrente elétrica, que é medida em função da aplicação de um potencial. Dessa forma, as informações sobre o analito são obtidas pela magnitude da corrente

elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007; WANG, 2000).

Na voltametria, o parâmetro ajustado é o potencial (E), enquanto o parâmetro medido é a corrente resultante (i), ou seja, $i = f(E)$. O voltamograma é o registro da corrente em função do potencial, e a magnitude da corrente obtida durante o processo de transferência de elétrons durante a oxirredução pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo. É importante ressaltar que o analito deve ser capaz de passar pela reação redox na amplitude de potencial estudada, a fim de ser detectado pela técnica voltamétrica (PACHECO et al., 2013; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica, conforme ilustrado na Figura 6, envolve a varredura do potencial enquanto o potenciostato registra a corrente gerada em função do potencial aplicado. A técnica utiliza a oxirredução do analito para gerar um voltamograma, que é um gráfico que representa a corrente em função do potencial. Essa varredura do potencial permite obter informações sobre o comportamento eletroquímico do analito, como a presença de picos de oxidação ou redução, que podem ser utilizados para identificação e quantificação do analito de interesse.

A direção da varredura inicial pode ser negativa ou positiva, dependendo da composição da amostra. Quando a varredura é na direção de potenciais mais negativos é chamada varredura direta e para potenciais positivos é varredura inversa. Para um experimento, os potenciais de inversão são escolhidos de maneira que a oxidação e a redução do analito possam ser analisadas.

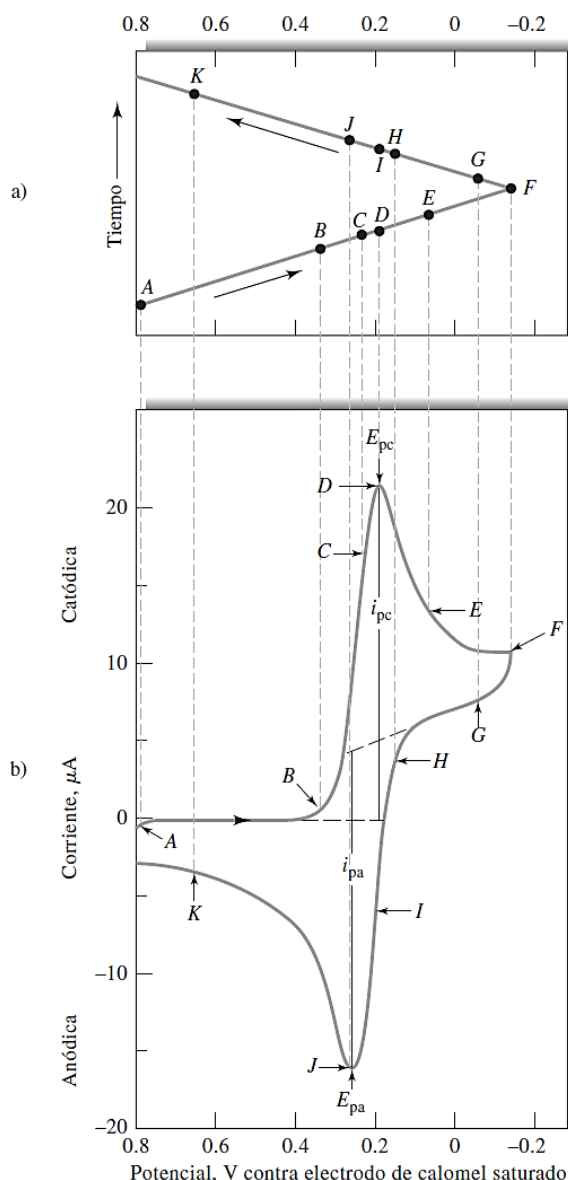


Figura 6. Exemplo hipotético de um voltamograma. (a) Potencial versus forma de onda ao longo do tempo e (b) voltammograma cíclico de um 6,0 mM solução de $K_3Fe(CN)_6$ e 1,0 M KNO_3 .

Fonte: (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007)

2.6.5 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A espectroscopia de impedância é um método poderoso para analisar a resistência elétrica de um sistema e é sensível a fenômenos de superfície e a alterações de propriedades em massa. Assim, no campo dos biossensores, ela é particularmente adequada para a detecção de eventos de que envolvam ligações moleculares. Além disso, é uma ferramenta valiosa na caracterização de modificações de superfície, por exemplo, em dispositivos transdutores durante o procedimento de imobilização de sistemas sensores (ENDO et al., 2008).

O princípio da técnica EIE é baseado na medição da impedância elétrica de um sistema eletroquímico em diferentes frequências. A impedância é uma medida da resistência elétrica do sistema a uma corrente alternada, que é definida como a razão entre a amplitude da tensão e a amplitude da corrente.

Na técnica EIE, um sinal de excitação de frequência variável é aplicado ao sistema eletroquímico, e a resposta do sistema é medida em relação à frequência. Essa resposta é geralmente apresentada como um diagrama de impedância complexa, que consiste em um gráfico de impedância em função da frequência. O diagrama de impedância complexa obtido pela técnica EIE é composto por dois componentes principais: a resistência (R) e a capacitância (C), que correspondem às propriedades elétricas do sistema eletroquímico (ENDO et al., 2008). Esta técnica é amplamente utilizada em diversas áreas da ciência e engenharia, incluindo a caracterização de materiais eletroquímicos, a análise de corrosão, a monitoração de processos eletroquímicos, entre outras aplicações.

2.6.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Observar a morfologia e estruturas dos materiais, desde a muito tempo, sempre foi galgado pelos pesquisadores, porém, a capacidade de observar a morfologia de um material diretamente está limitada pela capacidade de resolução do olho humano, que é de cerca de 100 μm . Isso significa que a menor distância possível entre dois pontos para que sejam percebidos como imagens separadas pelos sensores da retina do olho é de aproximadamente 100 μm . Portanto, a função de um microscópio é ampliar a imagem do objeto de modo que possa ser detectada pelo sistema olho-cérebro. É fundamental que a imagem apresente variação na intensidade luminosa ou cor para uma boa percepção (CANEVAROLO, 2003). A técnica é amplamente utilizada para examinar as características topográficas de várias superfícies, gerando imagens altamente detalhadas e nítidas, seu uso é altamente valorizado por conta da facilidade de preparação das amostras e a capacidade de obter imagens de alta qualidade. A MEV é especialmente adequada para analisar a morfologia de materiais em detalhes, permitindo aumentos de imagem superiores aos obtidos pela microscopia óptica.

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) apresenta um poder de ampliação intermediário, ficando entre o microscópio óptico (MO) e o microscópio eletrônico de transmissão (MET). No entanto, o MEV tem uma vantagem significativa

em relação ao MO, que é a sua alta resolução, que pode chegar a 2-5 nm (20-50 Å), e em alguns casos, até mesmo 1 nm (10 Å), enquanto a resolução do MO é de apenas 0,5 µm. Em comparação com o MET, a grande vantagem do MEV é a facilidade de preparação de amostras para análise, o que torna o MEV uma ferramenta útil em várias áreas da pesquisa científica (CANEVAROLO, 2003).

O funcionamento básico de um MEV envolve a produção de feixes de elétrons a partir de um filamento de tungstênio, que é aquecido pela aplicação de uma diferença de potencial. Esses elétrons são acelerados e direcionados para a amostra, permitindo a obtenção de imagens detalhadas da sua superfície. A Figura 7 apresenta um exemplo de um MEV em operação.

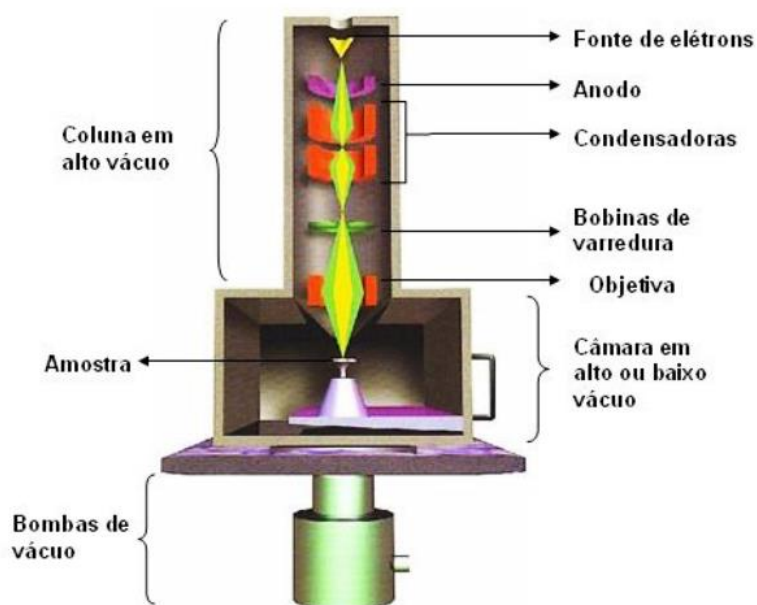


Figura 7. Representação esquemática da coluna do microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Fonte: (SOARES, 2011)

Os elétrons gerados no filamento do microscópio são atraídos pela parte positiva, causando sua aceleração em direção ao eletrodo positivo. As lentes condensadoras e o diafragma são responsáveis por corrigir o percurso dos feixes, reduzindo o diâmetro do feixe e focalizando-os na amostra. Antes de atingir a amostra, os feixes são ajustados em foco pela objetiva do microscópio.

2.6.7 Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ)

A microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ) é um dispositivo utilizado para medir a massa adsorvida ou a mudança de viscoelasticidade em uma superfície. Tem se mostrado uma poderosa ferramenta para investigar reações eletroquímicas que levam a mudanças na interface eletrodo/eletrólito em uma escala que pode ser detectada pela técnica. Além disso, tem se destacado por ser uma técnica de baixo custo quando comparada a outras técnicas eletroquímicas (VARELA; MALTA; TORRESI, 2000).

A operação da MECQ baseia-se no efeito piezoelétrico, que é a propriedade de certos materiais gerarem um campo elétrico quando são submetidos a deformações ou pressões externas. O efeito piezoelétrico direto ocorre quando a polaridade da perturbação mecânica varia, gerando um campo elétrico. O efeito piezoelétrico reverso ocorre quando um campo elétrico é aplicado ao material piezoelétrico, gerando uma deformação mecânica. Quando a perturbação elétrica é adequada em amplitude e frequência, o cristal oscila em um modo ressonante de cisalhamento, perpendicular ao campo elétrico. Isso permite que um cristal piezoelétrico possa ser usado na MECQ, além disso, é um equipamento muito empregado na caracterização da superfície de eletrodos (RODRIGUES et al., 2017; SOARES, 2011; VARELA; MALTA; TORRESI, 2000). A representação esquemática experimental da MECQ está descrita na Figura 8.

Durante as medições voltamétricas, o disco que atua como eletrodo de trabalho permanece em contato com a solução. O cristal de quartzo piezoelétrico é conectado a um circuito elétrico, onde é aplicado um potencial que resulta em uma deformação mecânica e na geração de um campo elétrico que faz com que o cristal vibre em uma frequência de ressonância, F . Se um potencial alternado for aplicado ao cristal de quartzo em frequências suficientemente altas, da ordem de 5-10 MHz, ocorrerão oscilações com amplitudes paralelas à superfície do cristal (VARELA; MALTA; TORRESI, 2000).

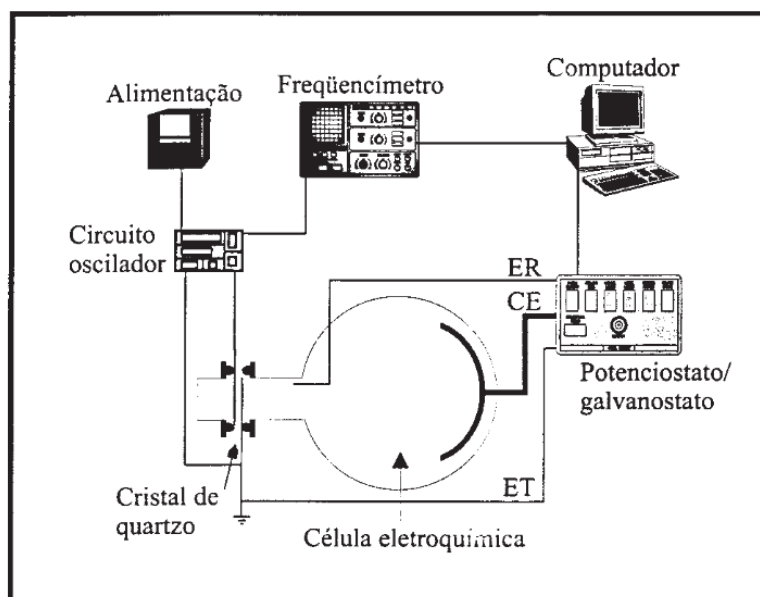


Figura 8. Exemplo esquemático do funcionamento da microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ).

Fonte: Varela e colaboradores (2000)

Quando uma das faces do cristal de quartzo piezoelétrico é colocada em contato com uma solução eletrolítica durante as medidas voltamétricas, ocorrem mudanças de massa, Δm , em sua superfície, que resultam em um deslocamento da frequência de ressonância, Δf . Esse deslocamento é influenciado pela densidade e condutividade específica do líquido. Quando essas propriedades são constantes, a frequência do cristal aumenta conforme a massa do eletrodo diminui. Dessa forma, o cristal atua como eletrodo de trabalho em uma cela eletroquímica convencional (JEFFREY; ZHENG; RITCHIE, 2000; NOMURA; IJIMA, 1981). É bastante difundida na caracterização da superfície dos eletrodos onde são crescidos filmes nanoestruturados (SOARES, 2011). Sucintamente, o funcionamento da MECQ se baseia em alterações na massa (ganho ou perda) na superfície de um eletrodo de cristal de quartzo (piezoelétrico), este eletrodo é usado para estabelecer um campo elétrico alternado através do cristal, ocasionando um movimento vibracional do cristal na sua frequência de ressonância. Esta frequência é sensível às variações de massa do cristal e do eletrodo, assim, à medida que há um aumento ou diminuição da massa, a frequência de ressonância oscila (VARELA; MALTA; TORRESI, 2000).

Desta forma, a frequência do cristal aumenta com a diminuição da massa do eletrodo e, o inverso também é verdadeiro, com a frequência diminuindo à medida que a massa do eletrodo aumenta. A técnica eletroquímica de MECQ tem se mostrado uma boa ferramenta para estudos na interface do eletrodo/analito, além disso se

destaca por seu baixo custo quando comparada a outras técnicas eletroanalíticas comumente utilizadas (VARELA; MALTA; TORRESI, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a potencialidade da HbAg como biossensor de metais pesados utilizando estudos da imobilização da proteína em eletrodos automontados e em suporte de quartzo e verificar sua interação com os metais pesados como cádmio, cobre e zinco em solução.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Estudos da interação da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) com alguns metais pesados (Zinco, Cádmio e Cobre) por meio de diferentes técnicas biofísicas como Absorção ótica, fluorescência e Intensidade de espalhamento de Luz (LSI);
2. Padronização da imobilização da HbAg nativa em sensores automontados e estudos da detecção de metais (cobre, cádmio e zinco) a partir da interação com a hemoproteína por medidas espectroscópicas e eletroanalíticas;
3. Estudos da caracterização do crescimento e morfologia dos filmes de PEI/HbAg observados por microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ), Impedância eletroquímica, voltametria cíclica e Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG).

4. METODOLOGIA

4.1 Extração e purificação da HbAg

A hemolinfa de 100 espécimes de *Amyntas gracilis* foi extraída com um corte na região do clitelo do animal que foi anestesiado em água gelada anteriormente. Essa hemolinfa foi centrifugada a 5.000 RPM, 4 °C por 10 minutos. Após este procedimento, foi dialisada em um contra-tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ por 24 horas. Em seguida, foi ultracentrifugada (Ultracentrífuga Beckman – IQ/Unesp Araraquara) a 60.000 RPM, 4°C por 5,5 horas. Após este processo a hemoglobina ficou sedimentada no fundo do tubo e o sobrenadante descartado. Então, a hemoglobina, em forma de “*pellet*”, foi ressuspensa com o auxílio de 2 mL de tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ pH 7,0.

No Laboratório de Biomoléculas, na Unesp de Registro, a hemoglobina foi submetida à sua última etapa de purificação, que consiste na purificação através de Cromatografia de Gel Filtração (CGF) utilizando uma coluna com fase estacionária Superdex 200 em cromatógrafo líquido AKTA Plus (General Electric). O cromatograma da purificação da HbAg é apresentado na Figura 9, onde um pico único e estreito evidencia a adequada purificação da hemoglobina. Após a obtenção da HbAg purificada, as concentrações foram determinadas espectroscopicamente utilizando os coeficientes de absorvidade molar $\epsilon_{415\text{nm}} = 5,0 \pm 0,6 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A solução estoque final, de aproximadamente 4 mL, apresentou concentração de 30 mg mL⁻¹.

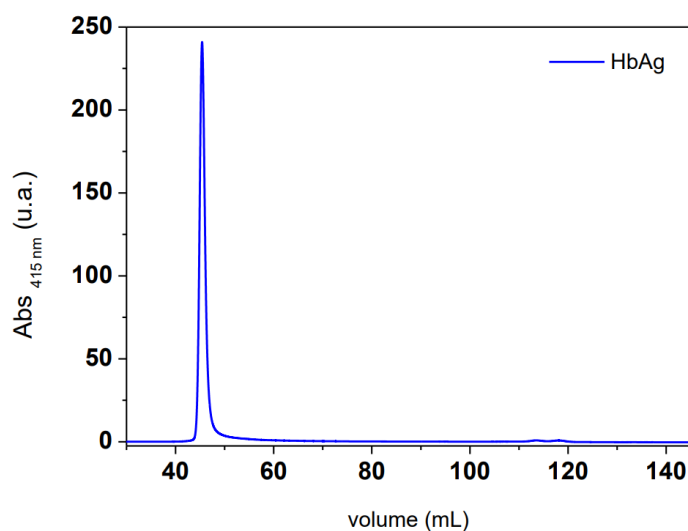


Figura 9. Cromatograma da purificação da HbAg 30 mg.mL⁻¹ obtido em coluna de gel de filtração superdex 200PG, em tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ pH 7,0 a 25 °C acoplada a um cromatógrafo líquido AKTA Pure (General Electric).

Fonte: autor

Esta etapa de purificação foi feita ordinariamente, de 3 a 4 vezes por ano, afim de sempre trabalhar com a hemoglobina mais nova possível para evitar possíveis oxidações provenientes do armazenamento. Esses parâmetros foram definidos em ensaios anteriores do grupo através da aferição dos espectros de absorção da hemoglobina mais antiga, além da comparação entre géis de eletroforese SDS e análises de DLS.

4.2 Eletroforese SDS PAGE

A técnica de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) consiste em separar as proteínas presentes em uma amostra com base em seu tamanho molecular. O SDS é um agente desnaturante que desenrola as proteínas e as carrega com uma carga negativa proporcional à sua massa. Ao aplicar um campo elétrico, as proteínas são separadas com base em seu tamanho, uma vez que as proteínas menores migram mais rapidamente através do gel. O gel é corado após a eletroforese para visualizar as proteínas separadas. O β -mercaptoetanol foi utilizado para reduzir as pontes dissulfeto existentes nas proteínas, facilitando sua separação. Esta molécula atua como um agente redutor, quebrando as pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína da proteína e reduz a proteína desnaturada a subunidades individuais. Além disso, ele também ajuda a minimizar a formação de agregados de proteínas durante o processo de eletroforese, o que pode levar a resultados imprecisos ou difíceis de interpretar.

A massa molecular das subunidades da HbAg e HbGp 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 de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. 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.

4.3 Metodologia de análises de Espectroscopia Uv-Vis, fluorescência e intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg e da Hemoglobina humana (HHb).

O preparo das amostras para as medidas de Espectroscopia de Absorção ótica (UV-Vis), emissão de fluorescência e intensidade de espalhamento de luz foram realizados através da diluição da HbAg para $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ no tampão acetato-fosfato-

borato 30 mmol L⁻¹. Após o preparo, as amostras permaneceram em equilíbrio por 3 horas em contato com os metais avaliados, metais estes obtidos através de soluções estoque de sulfato de cobre, cloreto de cádmio e sulfato de zinco. Em ensaios específicos, amostras permaneceram em equilíbrio de 3 à 72 horas, como mostrado mais à frente. Após a etapa de equilíbrio, as amostras foram centrifugadas a 5000 RPM por 10 minutos em uma centrífuga Eppendorf 5810R. As complexações ocorreram com concentrações crescentes dos metais, partindo da ausência do metal (0 µmol L⁻¹) até 100 µmol L⁻¹, para todos os metais analisados. Os experimentos foram realizados a 25°C, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm com varredura na faixa de 250 a 700 nm. As análises de fluorescência foram realizadas excitando as amostras em 295 nm, e medindo o espectro de emissão de 305 a 450 nm, com caminho ótico de 1,0 cm na excitação e na emissão. As análises de LSI foram realizadas no espectrofluorímetro, com uma cubeta de caminho ótico de 1 cm medindo a excitação e emissão em 350 nm. A hemoglobina humana (HHb) foi adquirida liofilizada da empresa Sigma-Aldrich, e o preparo da amostra seguiu o mesmo procedimento descrito para a HbAg, com diluição em 0,1 mg mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L⁻¹ e tempo de equilíbrio de 3 horas. Todas estas análises foram realizadas no espectrofotômetro Shimadzu UV1800 e espectrofluorímetro RF6000 no laboratório de Biomoléculas da UNESP em Registro/SP.

4.4 Preparo dos filmes em quartzo

O preparo dos filmes para as análises utilizando a HbAg imobilizada no quartzo foi realizada pela técnica de Layer-by-Layer. O substrato de quartzo foi previamente lavado com uma solução alcoólica de KOH para eliminar traços de gorduras e/ou outros contaminantes, tornando a superfície adequada para a adsorção de PEI, utilizado como suporte. Em seguida, o substrato foi mergulhado sequencialmente em quatro soluções distintas sendo uma de PEI 1 mg mL⁻¹, uma com água ultrapura, uma com HbAg 0,1 mg mL⁻¹ e uma com tampão fosfato 20 mmol L⁻¹.

Para adsorção do PEI o substrato permaneceu por 30 min na deposição da primeira camada e 3 minutos nas subsequentes. Após a adsorção com o polieletrólito PEI, o substrato permaneceu por 10 minutos em solução contendo HbAg em todas as camadas. Para as demais soluções (água e tampão) o substrato foi mergulhado apenas uma única vez por camada para retirar o excesso de moléculas fracamente

adsorvidas e uniformizar a deposição, seguindo a ordem PEI, água, solução de HbAg 0,1 mg mL⁻¹ e tampão fosfato.

Após 10 deposições em cada solução, o substrato tornou-se recoberto por dez bicamadas PEI/HbAg. Posterior ao crescimento, soluções dos metais (CuSO₄, CdCl₂, ZnSO₄ diluídos em água ultrapura) foram preparadas nas concentrações crescentes entre 0 e 70 µmol L⁻¹. O substrato foi interagido por 5 min com cada concentração do metal e monitorado no espectrofotômetro com uma varredura de 250 a 700 nm.

4.5 Análises voltamétricas

Para o crescimento dos filmes, o PEI, 1 g L⁻¹, foi utilizado de forma alternada nas camadas. Ao todo, dez bicamadas PEI/HbAg foram crescidas no eletrodo DRP-110 (Dropsens), seguindo a mesma metodologia citada no tópico acima (crescimento dos filmes no substrato quartzo), porém, ao invés de mergulhar o eletrodo, foi aplicado 200 µL de solução para cada camada (tanto para camada de PEI quanto para solução de HbAg 0,1 mg mL⁻¹), esse volume era retirado após o tempo descrito na seção acima. As leituras foram realizadas com tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ e as faixas de potencial abordadas foram de -0,6 até 0,6 volts com 3 ciclos, utilizando como base sempre o último ciclo. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Biomoléculas/Unesp Campus de Registro com o potenciostato µSTAT 200 da DROPSSENS cedido gentilmente pelo IEAMAR/Unesp.

4.6 Caracterização dos filmes

Para a caracterização dos filmes, utilizou-se as técnicas de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Impedância eletroquímica e Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ).

4.6.1 MEV

As medidas de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura (Digital Scanning Microscope) DSM 960 da Zeiss West Germany no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do IFSC/USP São Carlos.

As amostras foram depositadas nos eletrodos da mesma forma como mencionado em seções anteriores e presas com fita dupla-face em suportes de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma câmara a vácuo para remover a umidade. É importante salientar

que a camada de ouro foi fina o suficiente para permitir que o feixe de imagem atingisse a amostra sem ser absorvido, mas também fosse espessa o suficiente para garantir o contato elétrico e produzir uma imagem.

4.6.2 Impedância Eletroquímica

As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas no IFSC/USP São Carlos em um potenciostato/galvanostato Autolab PG STAT, 204 (Metrohm, Switzerland) controlado pelo software NOVA. Os eletrodos utilizados e o crescimento das bicamadas, assim como a interação com os metais são os mesmos descritos em seções anteriores.

4.6.3 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)

O crescimento das bicamadas PEI/HbAg foi avaliado com o auxílio da técnica de Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo. O equipamento utilizado foi o SRS (QCM200) do laboratório de polímeros do IFSC/USP em São Carlos. A deposição ocorreu sobre o eletrodo de ouro em cristal de quartzo seguindo os mesmos procedimentos descritos em seções acima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE A: Avaliação da HbAg como biossensor ótico de metais pesados

5.1.1 Interação da HbAg nativa com metais pesados: Estudos em solução

A partir da absorção ótica é possível estudar uma grande variedade de biomoléculas, verificando os aminoácidos aromáticos contidos nelas, tais como a fenilalanina, tirosina, triptofano e ligações peptídicas. 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 (POLI, 2006; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007). Nas hemoglobinas, utilizamos os comprimentos de onda entre 700 e 250 nm para monitorar no espectro de absorção as mudanças de interesse, pois, nesta região existem bandas características do grupo heme (anel porfirínico) das hemoglobinas. A banda de Soret que é uma banda característica das hemoglobinas está centrada em 415 nm e as bandas denominadas Q, encontram-se em 540 e 575 nm (α e β , respectivamente). Assim, monitorando estas bandas podemos acompanhar as mudanças do estado de oxidação do ferro do grupo heme. Desta forma, na Figura 10, é apresentada uma representação ilustrativa do espectro de absorção ótica da HbAg íntegra, ou seja, sem características de oxidação do grupo heme observadas frente a um espectro de uma amostra de HbAg oxidada. À medida que a hemoglobina se oxida, há um deslocamento para menores comprimentos de onda e alargamento das bandas de Soret, chegando em comprimentos de onda abaixo de 405 nm. As bandas Q alargam-se, tendendo a formar uma única banda. Há surgimento de uma banda em 500 nm e de uma banda em torno de 620 nm, denominada LMCT (banda de transferência de carga ligante-metal) (AGUSTINHO et al., 1996; POLI et al., 2006; RIBELATTO et al., 2006; SANTIAGO et al., 2008; TABAK et al., 2012).

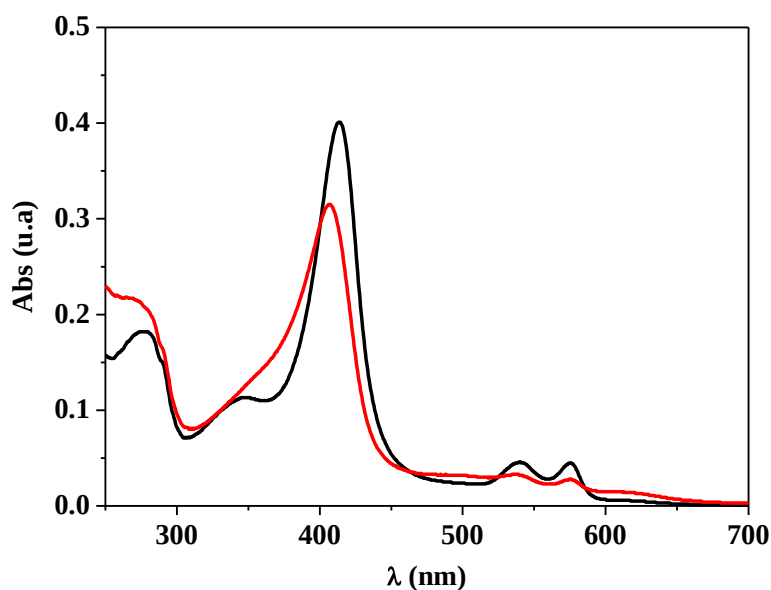


Figura 10. Espectros de absorção da HbAg íntegra (preto) e HbAg oxidada (vermelho). A banda centrada em 415 nm é denominada banda de Soret, as bandas em 540 e 575 nm são denominadas bandas Q. À medida que a hemoglobina se oxida, há um deslocamento para menores comprimentos de onda e alargamento das bandas de Soret. As bandas Q se alargam tendendo a formar uma única banda, além disso, há também o surgimento de uma banda em torno de 620 nm, denominada LMCT.

Fonte: Autor

Em estudos anteriores (SOUZA, 2018) da HbAg em solução observados por diferentes técnicas espectroscópicas como absorção ótica, fluorescência, espalhamento de luz e dicroísmo circular na presença de diferentes concentrações de metais pesados (cobre e cádmio), foi mostrado que o metal pesado cádmio não oxida, agrega ou tampouco dissocia a HbAg nas concentrações e condições testadas (0 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CdCl_2 e valores de pH de 5,0 e 7,0), mas, por outro lado, quando a proteína foi inserida em soluções com CuSO_4 ela sofreu oxidação, agregação, dissociação e perda de parte da sua estrutura secundária quando exposta às concentrações e condições testadas (0 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CuSO_4 e pH neutro). Já no pH 5,0 a HbAg nativa sofre oxidação mas não perde estrutura secundária e tampouco dissocia-se ou agrega-se (SOUZA, 2018). O espectro de absorção ótica da HbAg na presença de concentrações de cobre acima de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, no pH 7,0 e 5,0, desloca a banda de Soret de 415 para 404 nm, além de ser observado um alargamento e diminuição da intensidade desta banda. Nestas mesmas condições, foi observado que as duas bandas Q se alargam formando bandas em 500 e 620 nm, caracterizando oxidação do grupo heme (SOUZA, 2018).

5.1.2 Estudos de interação da HbAg nativa com zinco (ZnSO_4)

Seguindo as mesmas condições descritas com os metais pesados reportados acima, a HbAg foi adicionada a concentrações crescentes do metal zinco (obtido a partir de ZnSO_4). A centrifugação das amostras foi realizada para sedimentar e descartar os agregados HbAg-Zn em solução, estes agregados espalham luz e podem dificultar a interpretação dos resultados. A Figura 11 apresenta os espectros de absorção óptica da HbAg na ausência e presença do metal zinco para as amostras centrifugadas. Nota-se que, a partir da concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn, a intensidade de absorção da banda de Soret começa a diminuir. A diminuição da intensidade de absorção vai se intensificando com o aumento das concentrações do metal. Este fato pode estar relacionado com a formação de agregados HbAg-Zn, que, após a centrifugação, são retiradas da solução. Assim, retirando-se os agregados, diminui-se a presença de partículas grandes em solução provocando a redução no espalhamento de luz e na absorbância apresentada.

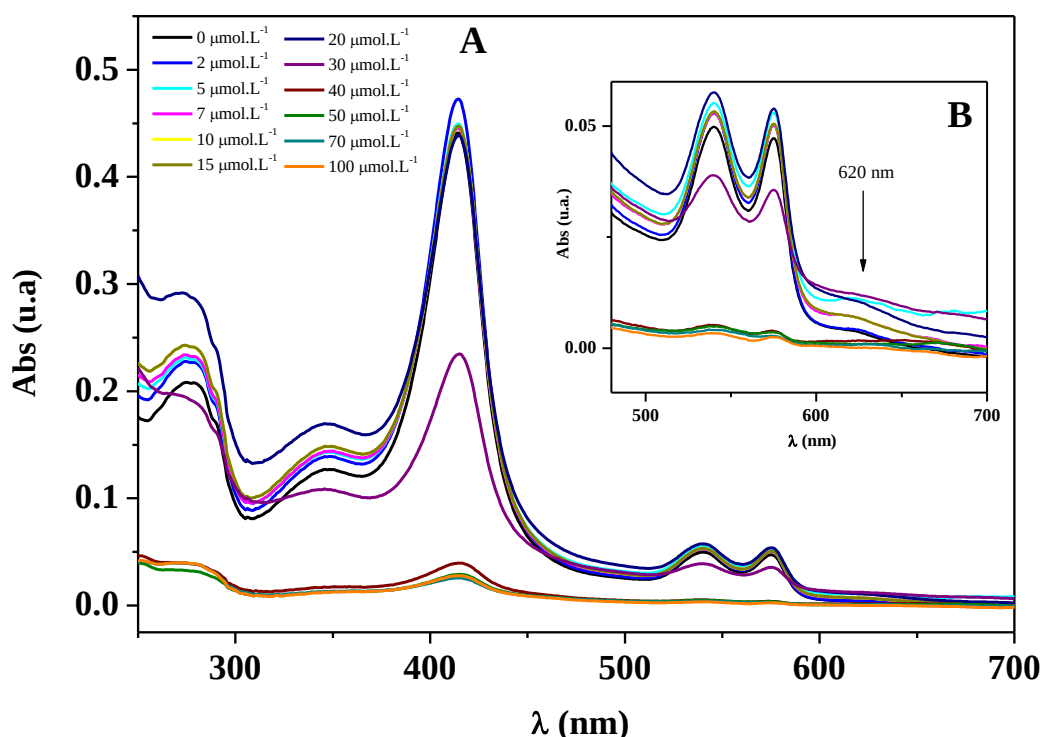


Figura 11. Espectros de absorção óptica da HbAg $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} pH 7,0 em função da concentração de ZnSO_4 na faixa de $0\text{-}100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ após centrifugação e equilíbrio de 3 horas.

Fonte: Autor

Observando a Figura 11, acima, pode-se notar que não houve deslocamento significativo da Banda de Soret para menores comprimentos de onda, porém, em concentrações acima de 20 de $\mu\text{mol L}^{-1}$, observou-se uma diminuição da intensidade de absorção, que pode estar associada a formação dos agregados HbAg–Zn que foram removidos durante o processo de centrifugação. Apesar da banda de Soret não se deslocar significativamente, as bandas Q se alargam e ocorre o surgimento de uma pequena banda na região de 620 nm, tais fatores sugerem uma oxidação parcial da HbAg.

A fluorescência é uma técnica valiosa para estudar processos de dissociação e desnaturação de proteínas. A fluorescência intrínseca de proteínas é comumente associada aos aminoácidos aromáticos presentes na sua composição, como a fenilalanina (Phe), triptofano (Trp) e a tirosina (Tyr). Esses aminoácidos geralmente exibem propriedades de fluorescência, o que torna possível monitorar mudanças na emissão de luz durante a dissociação ou desnaturação das proteínas. O triptofano é o aminoácido mais frequentemente monitorado em estudos de fluorescência, devido à sua capacidade de absorção exclusiva em 295 nm, uma vez que a fenilalanina e a tirosina não apresentam absorção significativa nessa faixa de comprimento de onda (λ). Além disso, o triptofano (Trp) é altamente sensível ao ambiente ao seu redor, exibindo diferentes características de fluorescência dependendo do grau de exposição a solventes hidrofílicos ou regiões hidrofóbicas da proteína. É importante destacar que o Trp possui um rendimento quântico maior em comparação com a fenilalanina e a tirosina. (AGUSTINHO et al., 1997; LAKOWICZ, 2006).

Na Figura 12 estão apresentadas as emissões de fluorescência da HbAg na presença de concentrações crescentes de zinco além do deslocamento do máximo de emissão de fluorescência. Os resultados das medidas espectroscópicas de emissão de fluorescência indicam que as variações na concentração de zinco induziram mudanças na estrutura terciária da HbAg, além disso, o deslocamento do máximo de emissão de fluorescência está relacionado com o meio onde os Trp se localizam, ou seja, o deslocamento de 331 para 314 nm pode estar relacionado com uma maior exposição dos Trp pelo solvente aquoso. De maneira geral para hemoproteínas, o aumento da exposição dos fluoróforos é associado ao processo de dissociação da molécula, ou seja, o aumento na emissão de fluorescência pode estar relacionado a dissociação da hemoglobina (SANTIAGO et al., 2007).

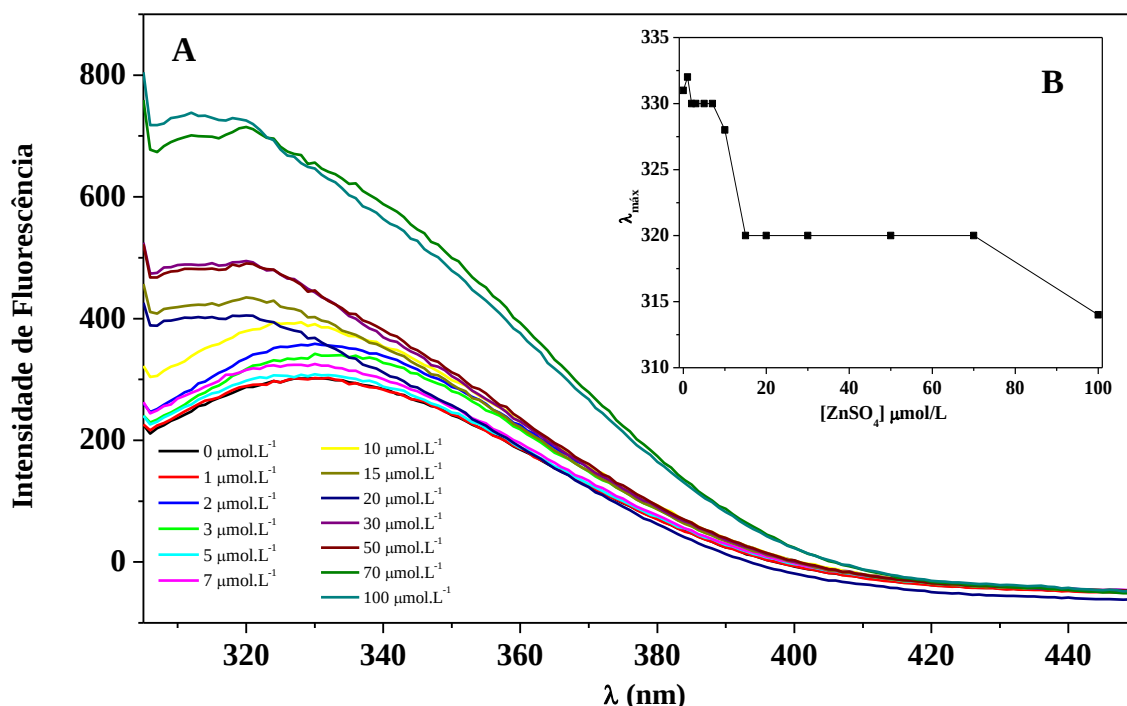


Figura 12. (A) Espectros de emissão de fluorescência da HbAg, 0,1 mg mL⁻¹, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L⁻¹ em função da concentração de ZnSO₄ explorada entre 0-100 μmol L⁻¹ em período de equilíbrio de 3 horas. (B) λ_{max} de emissão de fluorescência dos espectros apresentados.

Fonte: autor

A adição de 15 μmol L⁻¹ de zinco dobrou a intensidade de fluorescência da HbAg quando comparada com a HbAg na ausência de metal. Já em concentrações maiores, como 100 μmol L⁻¹, há um aumento de mais de 5 vezes na intensidade de fluorescência. As variações nas áreas dos espectros de emissão de fluorescência normalizadas pela área de emissão do espectro da proteína íntegra da HbAg na presença de zinco são mostradas na Figura 13. Tomando como base a área da fluorescência de cada amostra, é observado que a mesma aumentou mais de 2,5 vezes que a amostra na ausência do metal. Observa-se que a variação de fluorescência é significativa, corroborando com o ensaio de absorção ótica descrito acima.

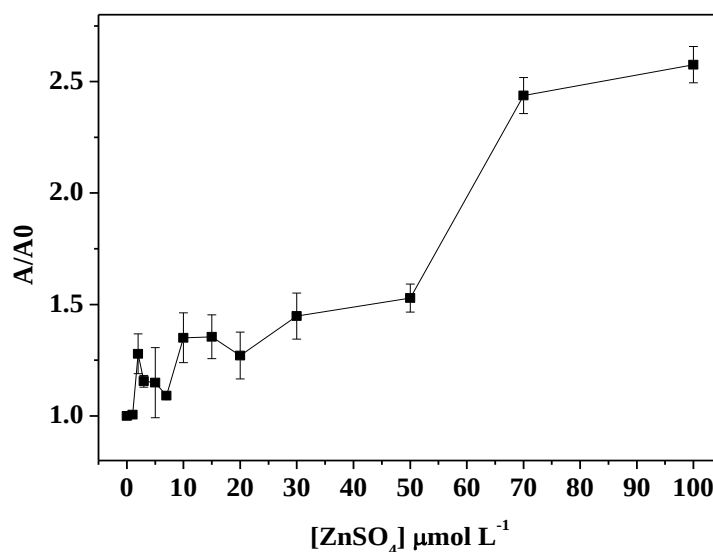


Figura 13. Áreas dos espectros de emissão em função da concentração de ZnSO₄ em pH 7,0, normalizadas pela área de emissão do espectro da proteína na ausência do metal, após o equilíbrio de 3 horas.

Fonte: autor

Assim, estes dados sugerem que a HbAg na presença de concentrações crescentes de ZnSO₄ sofre oxidação através dos dados de absorção, e através dos dados de fluorescência pode-se sugerir a dissociação da hemoproteína.

Na Figura 14 estão apresentados os dados de espalhamento de luz (LSI) da HbAg frente a adição de concentrações crescentes de sulfato de zinco (entre 0 e 100 μmol L⁻¹). O comportamento, neste ensaio, corrobora com o que foi apresentado por Souza (2018) em estudos da HbAg interagindo com cobre. É possível observar o aumento da LSI acima de 100.000 u.a. para a concentração de 20 μmol L⁻¹, sugerindo a agregação da proteína, e, posteriormente, um significativo decréscimo da intensidade de espalhamento de luz. O fenômeno observado pode ser explicado pelo fato de que, quando se faz a centrifugação das amostras, as partículas agregadas são parcialmente retiradas da solução. Assim, o aumento da LSI até a concentração de 20 μmol L⁻¹ é devido aos agregados proteína-metal que ainda permaneceram em solução e o posterior decréscimo na intensidade ocorre por conta da diminuição da quantidade de proteína em solução como consequência da centrifugação. Além disso, é possível associar este decréscimo da LSI devido a dissociação da HbAg na presença de Zinco, como mencionado nos ensaios de fluorescência. Dessa maneira, sugere-se a possível agregação da proteína na presença de zinco (agregados HbAg-Zn), e uma parcial oxidação e dissociação da HbAg.

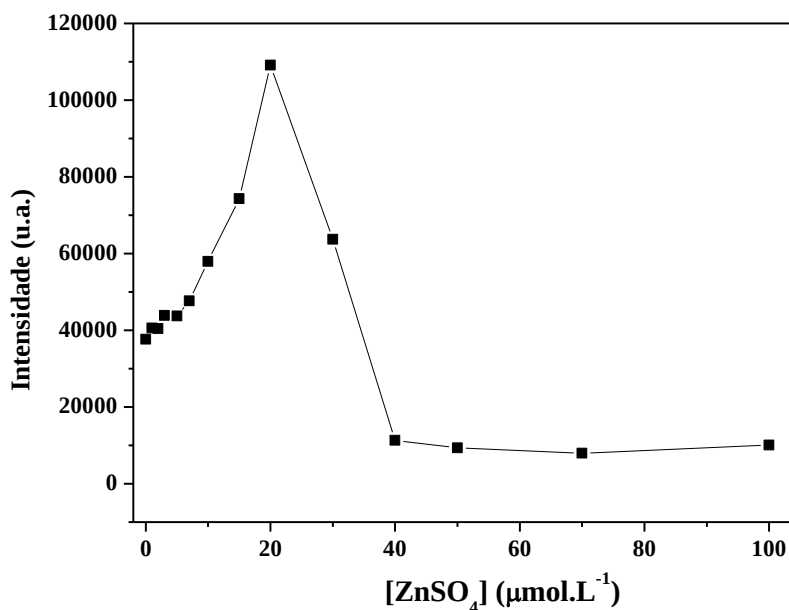


Figura 14. Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg 0,1 mg mL⁻¹, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L⁻¹ pH 7,0 em função da concentração de ZnSO₄ na faixa de 0-100 μmol L⁻¹ após 3 horas de equilíbrio.

Fonte: autor

Com o intuito de compararmos os dados da interação da HbAg com metais pesados com os da hemoglobina humana nas mesmas condições, na Figura 15, são mostrados os espectros de absorção ótica, espalhamento de luz e fluorescência da hemoglobina humana (HHb) frente ao metal zinco.

Como pode ser observado, a hemoglobina humana não apresenta mudanças significativas em seu espectro de absorção ótica frente aos metais, isso pode estar relacionado ao fato de que a hemoglobina liofilizada utilizada já estava oxidada quando ressuspendida, o que não acontece com a HbAg que, como mostrado na Figura 16, após o processo de liofilização, encontra-se parcialmente oxidada, deslocando seu espectro de absorção do pico de Soret de 415 nm para 413 nm, um deslocamento significativamente menor do que os 406 nm de deslocamento do pico de Soret encontrado nos espectros da HHb apresentados. Para os dados de fluorescência, não há variação significativa.

Com relação aos estudos por LSI, há um aumento da intensidade de espalhamento de luz entre 10 e 20 μmol L⁻¹ da ordem de 3 vezes, o que pode estar relacionado à agregação da HHb em contato com o metal zinco, porém, a intensidade de espalhamento diminui aos valores da HHb na ausência de metal, o que pode sugerir uma ressolubilização dos agregados da hemoproteína.

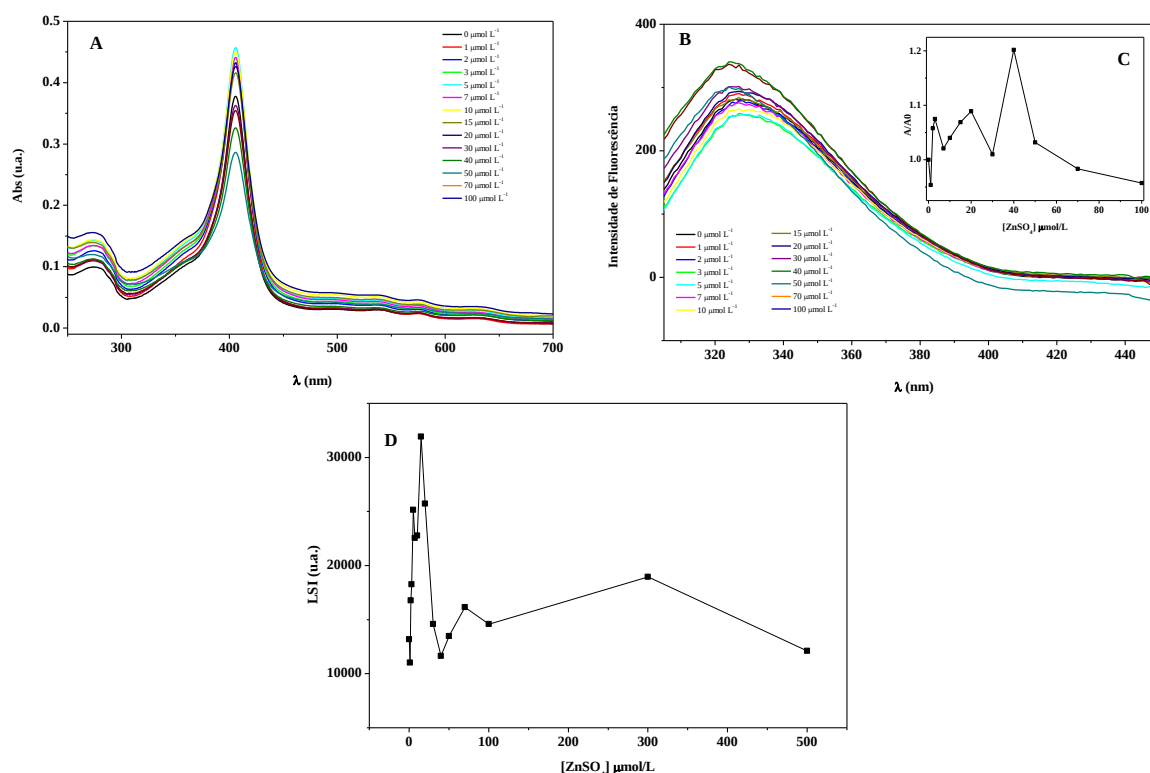


Figura 15. Espectroscopia da HHb frente ao sulfato de zinco. (A) Intensidade de espalhamento de luz (LSI), (B) Espectros de emissão de fluorescência e (C) sua área normalizada e (D) Espectro UV-Vis da HHb 0,1 mg mL⁻¹, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L⁻¹ pH 7,0 em função da concentração de ZnSO₄ na faixa de concentração de 0 a 100 μmol L⁻¹ com tempo de equilíbrio de 3 horas.

Fonte: Autor

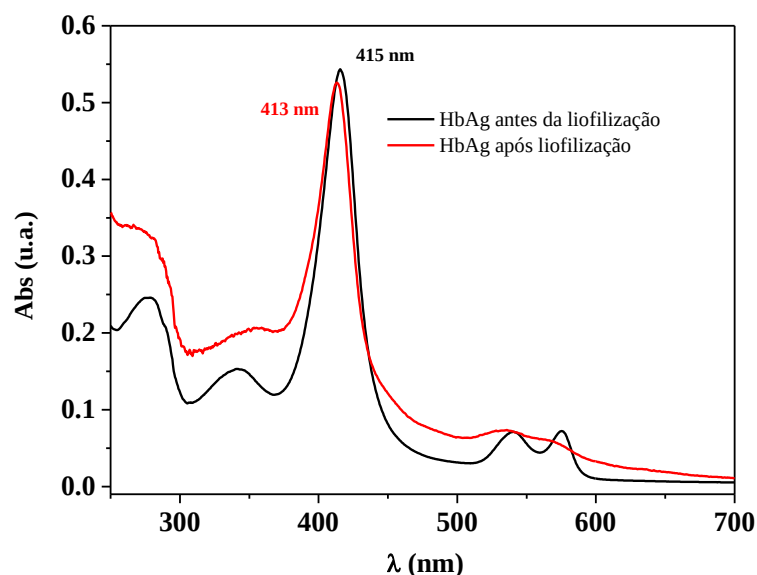


Figura 16. Espectros de absorção ótica da HbAg antes e após a liofilização. (A) espectro da HbAg antes da liofilização e (B) espectro da HbAg ressuspenso após a liofilização.

Fonte: Autor

A Figura 16 mostra que o processo de liofilização da HbAg e sua posterior ressusensão acarreta na oxidação de seu grupo heme. O espectro mostra a banda

de Soret deslocada de 415 nm para 413 nm e as bandas Q alargadas, o que caracteriza processo de oxidação. Logo, esse processo de liofilização da hemoglobina não é viável quando o objetivo são os estudos de monitoramento da oxidação do grupo heme.

5.1.3 Estudos da interação da HbAg com cádmio (CdCl_2).

Em posse das informações descritas no início desta seção, onde foi apresentado que resultados anteriores da interação da HbAg com cádmio (0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CdCl_2) não indicaram mudanças significativas no processo de oxidação e dissociação da hemoproteína, neste momento, são apresentados os resultados dos estudos da HbAg frente a concentrações ainda maiores do metal (na faixa de 0 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CdCl_2). Desta forma, buscou-se observar as possíveis oxidações e definir em qual concentração de cádmio a hemoproteína se oxida, dissocia ou agrega-se. Além disso, também foram utilizados tempos de interação da hemoglobina com o metal em um intervalo de tempo maior, até 72 horas, a fim de avaliar uma possível oxidação na mesma. Os espectros de absorção ótica das amostras de HbAg em contato com cádmio em 3, 24, 48 e 72 horas sem centrifugação estão mostrados na Figura 17. Nas amostras acondicionadas à 25 °C durante o período dos experimentos (72 horas), é possível observar que há um significativo aumento da absorbância à medida que a concentração de metal aumenta, ficando mais evidente na faixa de comprimento de onda entre 250 a 300 nm. Este aumento pode estar associado ao espalhamento de Rayleigh em que, quanto menor o comprimento de onda, mais intenso é o espalhamento. Além disso, nota-se que mesmo aumentando significativamente (para concentrações de até 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a concentração de metal incidida sobre a HbAg, não houve deslocamento da banda de Soret nem alargamento das bandas Q, confirmando que a hemoproteína não se oxida nas condições analisadas.

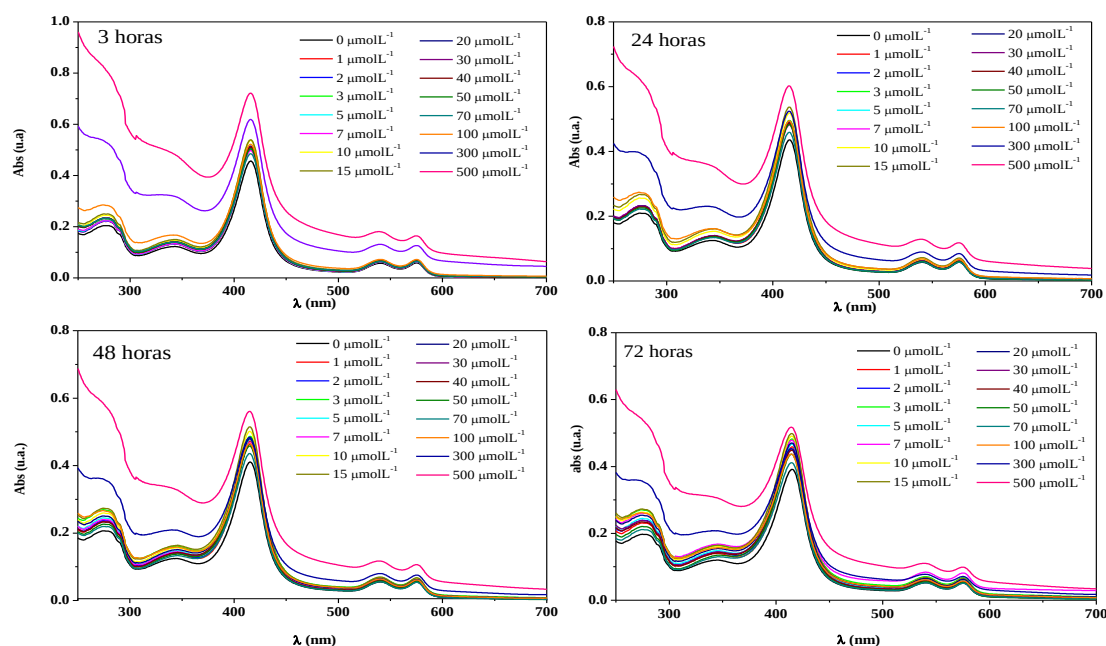


Figura 17. Espectros de Absorção ótica da HbAg $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ interagida com concentrações crescentes de CdCl_2 (0 a $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) em 3, 24, 48 e 72 horas de interação sem centrifugação. Todos os ensaios utilizaram o tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L^{-1} .

Fonte: Autor

Na Figura 18, são apresentadas as amostras após 72 horas de interação e centrifugadas antes das medidas de absorção ótica. É possível notar que não há deslocamento da banda de Soret, não há alargamento das bandas Q e não é notada a presença de bandas em 620 nm. Desta forma, observa-se que a HbAg não se oxida na presença do cádmio nas condições avaliadas e que o aumento da intensidade de absorção (250 a 390 nm) observado na figura 17 se deve a presença de altas concentrações de sais de cádmio (acima de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$).

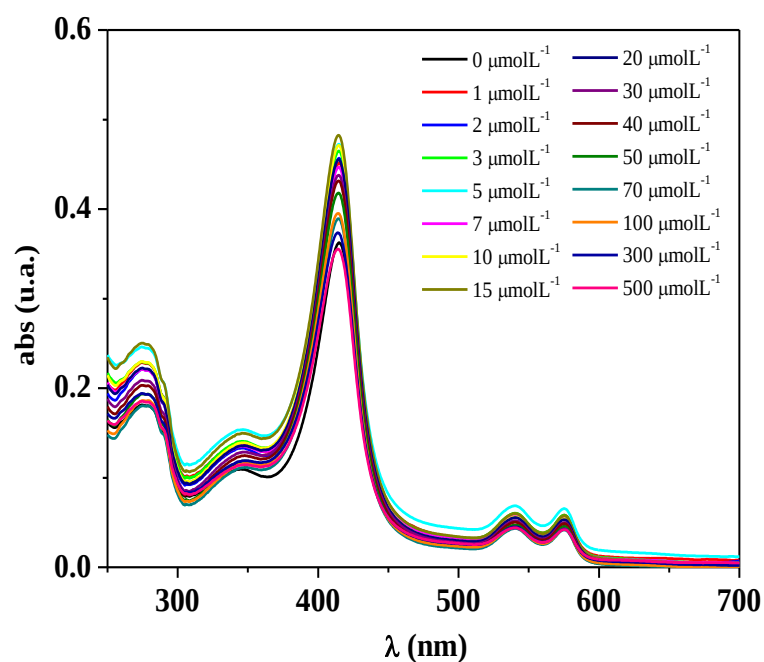


Figura 18. Espectros de Absorção ótica da HbAg $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ interagida com concentrações crescentes de CdCl_2 (0 a $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) 72 horas de interação com centrifugação.

Fonte: Autor

Após as medidas de absorção ótica, foram realizados ensaios de espalhamento de luz no fluorímetro e fluorescência destas mesmas amostras, e os dados estão apresentados nas Figuras 19 e 20, respectivamente. Na Figura 19, é mostrada a emissão de fluorescência da mesma amostra em períodos diferentes com 3, 24, 48 e 72 horas, a fim de induzir a dissociação e/ou oxidação da HbAg. Em concentrações acima de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, há um aumento na emissão de fluorescência. Este aumento da intensidade de fluorescência em um primeiro momento poderia estar relacionado com um processo de dissociação da hemoproteína nas condições analisadas ou a presença de sais de cádmio complexado com os tampões.

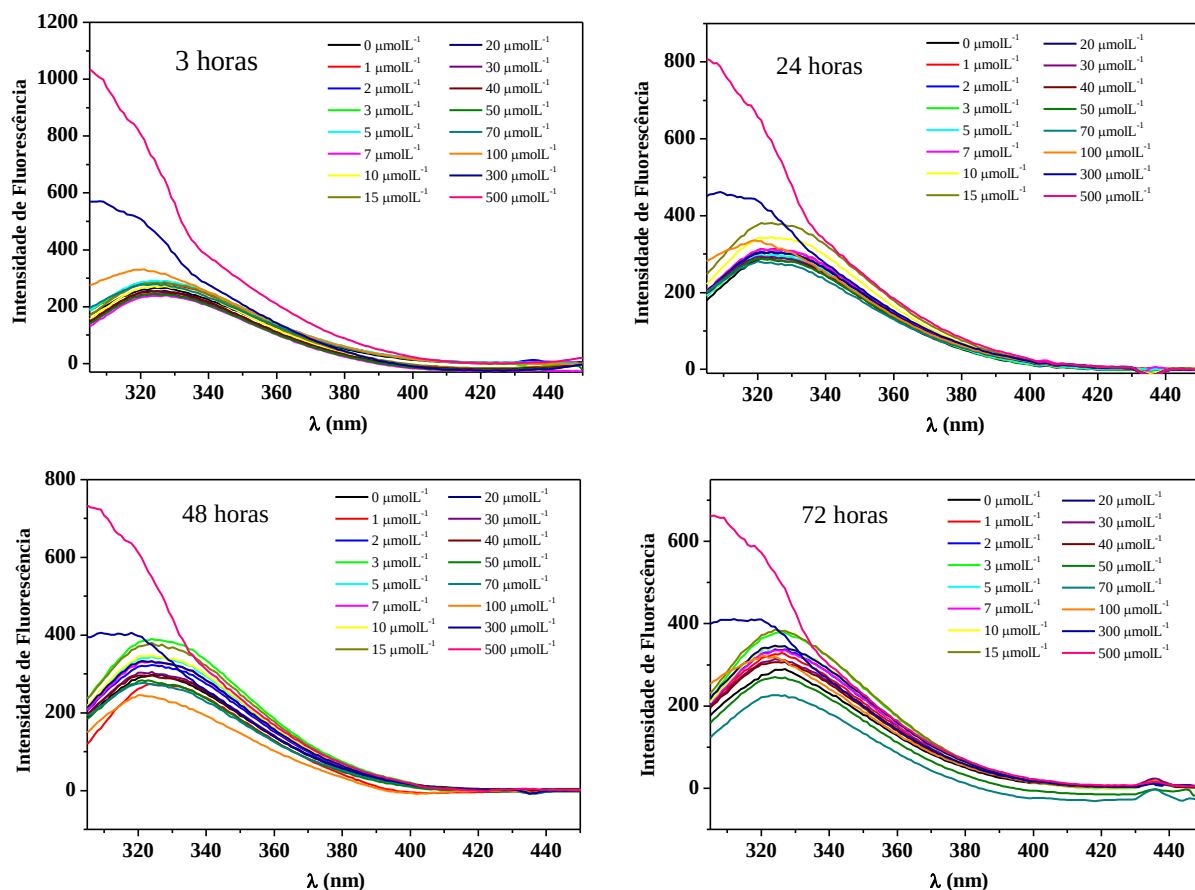


Figura 19. Espectros de emissão de fluorescência da HbAg, 0,1 mg mL⁻¹, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L⁻¹, pH 7,0, em função da concentração de CdCl₂ explorada entre 0-500 μmol L⁻¹ em período de equilíbrio de 3, 24, 48 e 72 horas. Todas as amostras foram centrifugadas.

Fonte: Autor

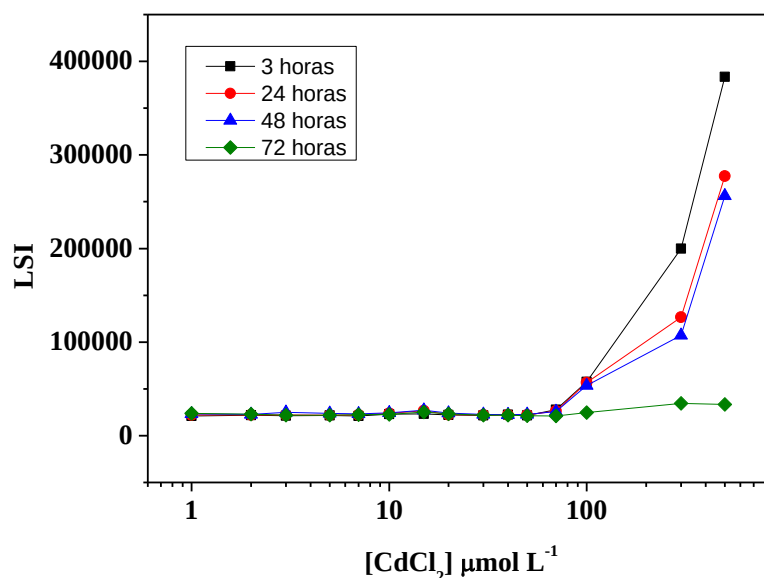


Figura 20. Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg 0,1 mg mL⁻¹, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L⁻¹ pH 7,0 em função da concentração de CdCl₂ na faixa de concentração de 0 a 500 μmol L⁻¹ com tempo de equilíbrio de 3, 24, 48 e 72 horas.

Fonte: Autor

Nos estudos de interação da HbAg com cádmio monitoradas por UV-vis, nota-se que mesmo com a maior concentração de metal na solução não há evidências de oxidação, pois os espectros de absorção ótica não apresentaram deslocamento da banda de Soret, alargamentos das bandas Q e surgimentos das bandas de LMCT (Figura 18). O aumento da intensidade de fluorescência observada para concentrações acima de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ pode estar relacionado com o aumento da intensidade de espalhamento de Rayleigh observada para estes valores de concentrações. Os dados de LSI também apresentaram um aumento da intensidade de espalhamento de luz para concentrações acima de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 20).

Um estudo de absorção ótica, fluorescência e LSI de soluções de sais de metais pesados solubilizados no tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L^{-1} foi realizado. Neste estudo, verificou-se que para concentrações de sais de metal pesado acima de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, um aumento do espalhamento de luz (dados não mostrados) foi notado nos espectros obtidos pelas três técnicas espectroscópicas. Desta forma, é possível propor que o aumento de fluorescência e LSI, observado nas figuras 19 e 20, respectivamente, após 3 horas de equilíbrio, estão associadas a presença de pequenos agregados de metal complexado com o tampão de solubilização.

Do mesmo modo que foi realizado para as amostras contendo metal zinco, foi utilizada a hemoglobina humana (HHb), para efeito de comparação. Na Figura 21, são mostrados os espectros de absorção ótica, espalhamento de luz e fluorescência da hemoglobina humana (HHb) em contato com as concentrações crescentes de cloreto de cádmio (0 a $500 \mu\text{mol L}^{-1}$).

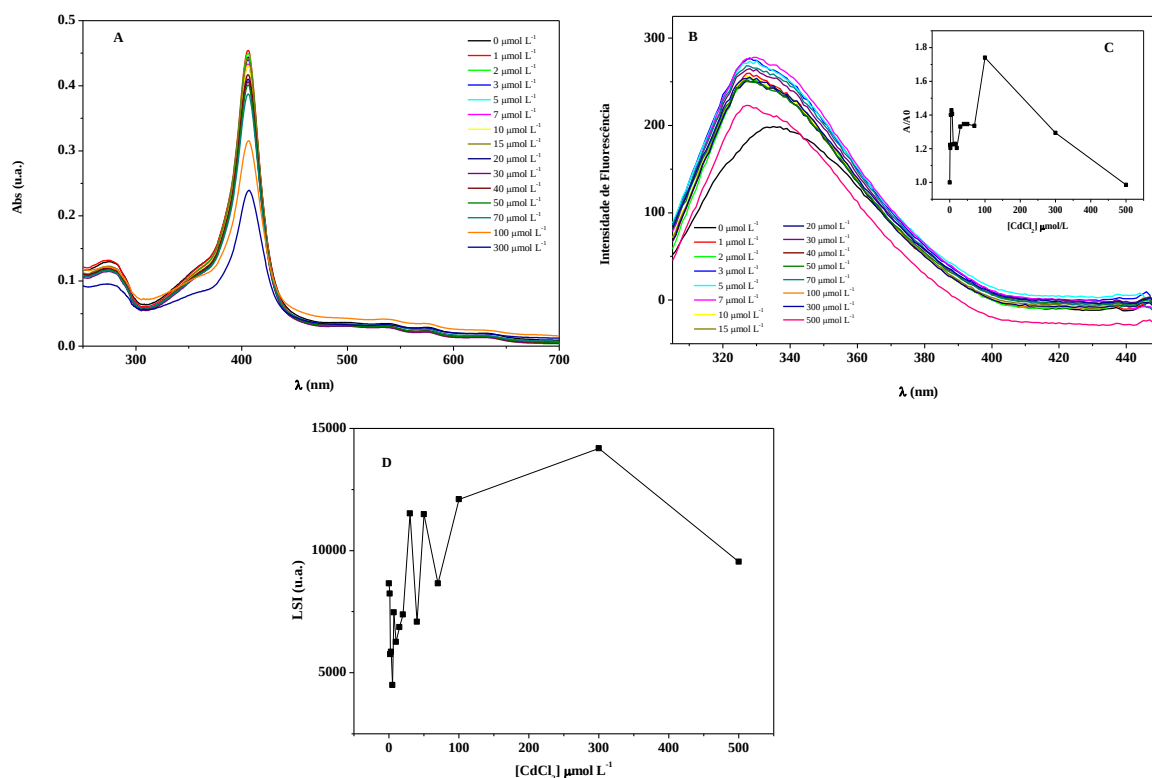


Figura 21. Espectroscopia das amostras de HHb com cádmio. (A) Espectro UV-Vis da HHb 0,1 mg mL⁻¹ (B) Espectros de emissão de fluorescência e a área de seus espectros normalizada (C) e (D) Intensidade de espalhamento de luz (LSI), em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol L⁻¹ pH 7,0 em função da concentração de CdCl₂ na faixa de concentração de 0 a 500 µmol.L⁻¹ com tempo de equilíbrio de 3 horas.

Fonte: Autor

Da mesma forma com o que foi realizado nas amostras de HHb interagidas com zinco, nota-se que a HHb não apresenta deslocamentos significativos do seu espectro UV-Vis, apresentando a banda de Soret centrada em 406 nm, evidenciando que a proteína já se encontra em processo de oxidação. Com relação ao espalhamento de luz, vemos um ligeiro aumento na intensidade, da ordem de 1,5 vezes, sugerindo agregação da mesma. Estes dados corroboram a ideia da utilização da HbAg frente à HHb devido a sua maior estabilidade oligomérica e resistência à oxidação, como apresentado na Figura 16.

5.1.4 Medidas de eletroforese monodimensional SDS-PAGE

Com o intuito de avaliarmos um possível efeito na alteração da massa molar da HbAg (mais especificamente das suas subunidades) na presença dos metais pesados, estudos de SDS-PAGE foram realizados. Nas Figuras 22 e 23, respectivamente, são apresentados os géis de SDS-PAGE na ausência e na presença do agente redutor β-mercaptoetanol, respectivamente. O poço (P) corresponde ao

padrão de massa molecular usado para a calibração das massas aparentes das bandas presentes no gel. Os poços B, C, D e E correspondem a HbAg na ausência e na presença de diferentes metais pesados, já os poços F, G, H e I correspondem a HbGp nas mesmas condições de estudos da HbAg. A proteína HbGp foi utilizada neste estudo como um padrão de hemoproteína, uma vez que a HbGp é uma proteína ortóloga a HbAg, e uma proteína bastante estudada na literatura (CARVALHO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2020).

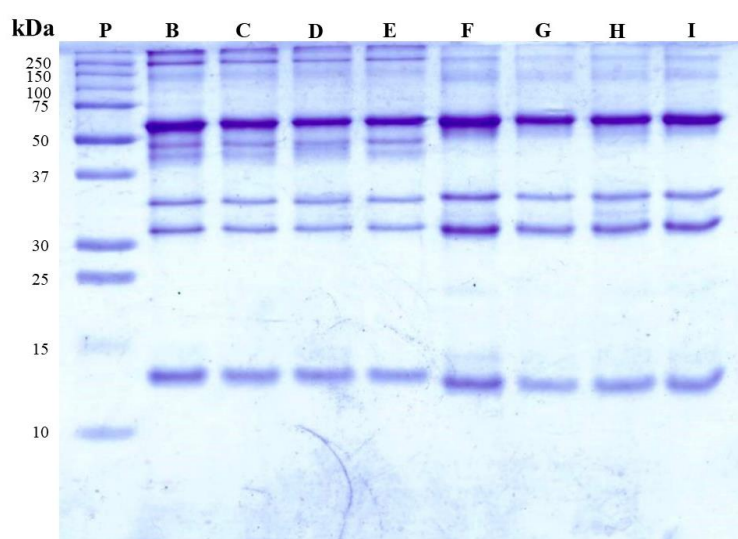


Figura 22. Eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% da HbGp e HbAg na ausência de β -mercaptoetanol. Onde P: padrão de peso molecular (Precision Plus Protein, Bio-Rad), B: HbAg Nativa; C: HbAg + Cu; D: HbAg + Cd; E: HbAg + Zn; F: HbGp nativa; G: HbGp + Cu; H: HbGp + Cd; I: HbGp + Zn.

Fonte: Autor

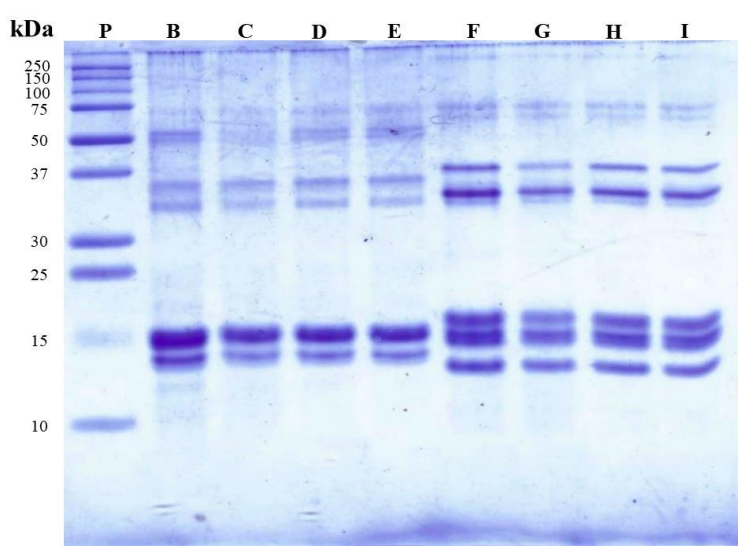


Figura 23. Eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% da HbGp e HbAg na presença de β -mercaptoetanol. Onde P: padrão de peso molecular (Precision Plus Protein, Bio-Rad), B: HbAg Nativa; C: HbAg + Cu; D: HbAg + Cd; E: HbAg + Zn; F: HbGp nativa; G: HbGp + Cu; H: HbGp + Cd; I: HbGp + Zn.

Fonte: Autor

É possível observar, através da Figura 22 que, na ausência de β -mercaptoetanol, os resultados foram semelhantes tanto para o poço contendo HbAg nativa (na ausência dos metais) quanto para a HbAg na presença dos metais cobre, cádmio e zinco. Verificamos a presença de quatro bandas, sendo que a banda em torno de 75 kDa pode representar os tetrâmeros [abcd], as bandas localizadas entre 37 e 30 kDa possivelmente são trímeros e a banda que aparece isolada entre 15 e 10 kDa corresponde a uma das subunidades monoméricas (CARVALHO et al., 2011; IMASATO et al., 1997; SEBASTIÃO, 2022). Na Figura 23, observa-se que, na presença de β -mercaptoetanol, ocorre o desaparecimento da banda correspondente ao trímero *abc*, em torno de 59 kDa para a HbAg, e em torno 58 kDa para a HbGp. O ocorrido é consequência do β -mercaptoetanol que promove a redução das ligações dissulfeto existentes na subunidade trimérica, que irá se dividir em subunidades monoméricas. De maneira geral, os metais não afetaram o perfil eletroforético HbAg e HbGp.

5.1.5 HbAg aplicada como um sistema ótico de detecção de metais pesados.

Como mostrado em seções anteriores, os estudos espectroscópicos da HbAg na presença de diferentes concentrações de cádmio não mostraram alterações significativas que pudessem indicar a oxidação da proteína. Já a interação da HbAg com Cobre mostra a oxidação, dissociação e agregação da proteína em algumas condições de análises. A interação da HbAg com zinco também não apresenta alterações significativas nos espectros de absorção ótica, nem mesmo deslocamento da banda de Soret para menores comprimentos de onda. Assim, como este trabalho prevê a possível elaboração de um biossensor utilizando a HbAg como uma biomolécula ativa, foi avaliado, a partir de então, a oxidação da HbAg frente ao metal cobre monitorado por técnicas de espectroscopia ótica.

A HbAg foi imobilizada em um substrato sólido de quartzo e colocada em contato com metal cobre para certificar-se que a hemoproteína apresenta os mesmos espectros UV-vis que em solução. A Figura 24 mostra a HbAg imobilizada em substrato sólido de quartzo juntamente com o biopolímero polietilenoimina (PEI), observa-se a interação do cobre com as bicamadas PEI/HbAg. Nota-se que a banda de Soret desloca-se de 415 para 412 nm, além de um alargamento nas bandas Q (535 e 570 nm), sugerindo uma parcial oxidação da mesma, reforçando a ideia de sua possível utilização como um sensor ótico.

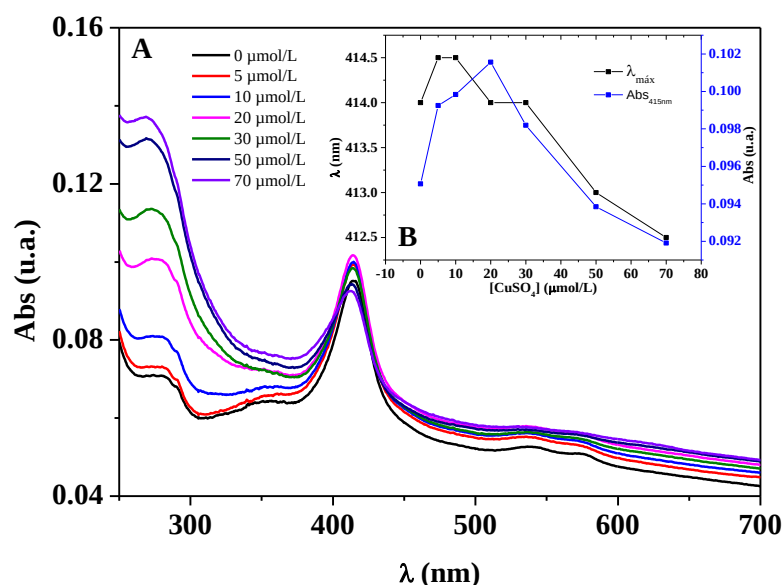


Figura 24. (A) Apresentação da bicamada PEI/HbAg, crescidas por LBL em substrato de quartzo, interagidas com concentrações crescentes de sulfato de cobre (0 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e monitorada por espectrofotometria Uv-Vis. (B) Deslocamento do comprimento de onda máximo da banda Soret e sua intensidade de absorção.

Fonte: autor

A avaliação da oxidação do centro férrico destas hemoglobinas é realizada, dentre outras técnicas, pelo monitoramento do espectro UV-Vis, observando as mudanças na Banda de Soret, a qual é centrada em 415 nm na forma oxi, e se desloca para valores próximos a 405 nm quando oxidada, alargando-se e diminuindo a sua intensidade de absorção. Já as bandas Q (540 e 575 nm) se alargam e formam um pico único (TABAK et al., 2012).

Em se tratando da oxidação do grupo heme desta classe de hemoproteínas, nota-se que estas hemoglobinas se oxidam em concentrações baixas de metais pesados e surfactantes quando comparado a outro agente caotrópico como a ureia. Carvalho e colaboradores (2012) promoveram a oxidação e posterior dissociação da HbGp por ureia e verificaram, através das técnicas de DLS, Espectroscopia UV-Vis, LSI e dicroísmo circular (CD), que concentrações acima de 4 mol L⁻¹ causam oxidação e dissociação da proteína. Já em estudos posteriores, Carvalho e colaboradores (2013b), utilizando ultracentrifugação analítica e espalhamento de luz a baixo ângulo (AUC e SAXS, respectivamente), observaram que em concentrações abaixo de 4 mol L⁻¹ de ureia a estrutura quaternária da HbGp não se altera. Santiago e colaboradores (2007) verificaram a oxidação da HbGp, pH 7,0, proporcionada pela interação com os surfactantes CTAC e SDS, uma vez que a banda de Soret, para a interação com

CTAC, começa a diminuir sua intensidade em concentrações de $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ e, em concentrações acima de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, há um significativo alargamento das bandas Q. Nos estudos com o surfactante SDS observou-se um significativo alargamento das bandas Q para concentrações de SDS maiores que $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$.

Ramos (2017) realizou estudos com a HbAg em função dos surfactantes CTAC e SDS em dois valores de pH (5,0 e 7,0). A partir dos resultados deste autor, é possível notar que a hemoproteína mostra sinais de oxidação na presença de concentrações de CTAC acima de $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$ e, para o SDS, a hemoglobina inicia a oxidação acima de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Em estudos de interação da HbAg com metais pesados, Souza (2018) verificou a oxidação da HbAg em concentrações acima de $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de cobre. Nesta concentração, a Banda de Soret da hemoglobina se desloca para 404 nm, diminui a intensidade, as bandas Q começam a se alargar e uma banda aparece em 620 nm, processo este característico de oxidação do grupo heme. Assim, é notado que estas hemoproteínas são mais sensíveis a interação com cobre, do que com os surfactantes e ureia.

A seguir são apresentados estudos de absorção ótica da bicamada PEI/HbAg imobilizada no quartzo com concentrações crescente de Cobre. Variação do tempo de interação (2, 5 e 8 minutos) do metal com a bicamada foram realizados. É importante mencionar que as medidas realizadas em solução (SOUZA, 2018) têm um tempo de equilíbrio de 3 horas e, neste experimento com a hemoglobina imobilizada, o tempo foi reduzido significativamente. A Figura 25 mostra o deslocamento da banda de Soret das bicamadas PEI/HbAg com a adição de Cobre conforme descrito acima.

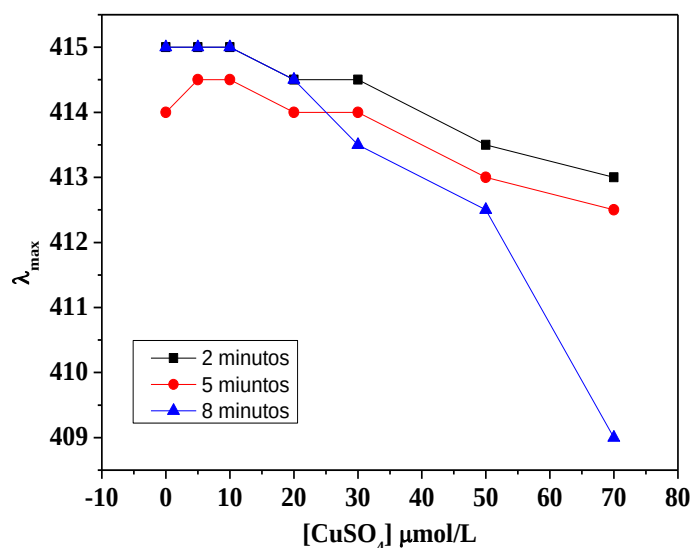


Figura 25. Deslocamento do λ máximo das bandas de Soret das bicamadas PEI/HbAg, crescidas por LBL em substrato de quartzo, interagidas com concentrações crescentes de sulfato de cobre (0 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 2, 5 e 8 minutos e monitoradas por espectrofotometria UV-Vis.

Fonte: autor

A partir destes resultados, pode-se observar um maior deslocamento da banda de Soret quando interagida a bicamada com o metal cobre por 8 minutos. O λ máximo da banda de Soret deslocou-se de 415 para 409 nm, caracterizando a parcial oxidação do grupamento heme da HbAg imobilizada.

A partir dos dados apresentados até aqui, é evidente que a HbAg é sensível aos metais analisados e, em maior grau, para o metal cobre. Desta forma, a proposta de utilização da molécula como biossensor ótico é corroborada, tanto da hemoproteína em solução quanto imobilizada no substrato sólido de quartzo. A utilização da transição do pico de Soret para menores comprimentos de onda à medida que a concentração de metal cresce pode ser utilizada como parâmetro para o futuro sensor ótico. Além disso, de acordo com os dados da literatura mostrados anteriormente a HbAg é altamente sensível aos metais quando comparado a outros agentes caotrópicos como ureia e alguns surfactantes. Enquanto os estudos com ureia utilizam concentrações em mol L^{-1} para oxidar a proteína e os trabalhos com surfactantes utilizam concentrações na ordem de mmol L^{-1} , os resultados apresentados nesse trabalho são da ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$, evidenciando a sensibilidade que a HbAg apresenta para com estes metais.

5.2 PARTE B: Avaliação da HbAg como biossensor eletroanalítico de metais pesados

A partir dos dados obtidos em seções anteriores deste trabalho, verificou-se que a HbAg dispõe de potencial para a utilização como sensor ótico. A partir disso, foi avaliada a possibilidade de a HbAg atuar também como um sensor eletroanalítico. Desta forma, a caracterização dos eletrodos e as análises eletroanalíticas são mostradas a seguir.

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG)

A técnica MEV-FEG, também conhecida como Microscopia Eletrônica de Alta Resolução, permite a observação de detalhes morfológicos dos materiais com resolução de 1 nm, e pode ser usada para auxiliar na determinação do tamanho de partículas de no mínimo 10 nm. Através desta técnica, é possível obter imagens topográficas de filmes de diferentes superfícies, produzindo imagens de grande resolução e nitidez. Desta forma, estudos do crescimento das ilhas adsorvidas, porosidade, contaminantes, granulometria e morfologia das superfícies podem ser realizados. Até mesmo estudos de detecção já foram reportados utilizando a técnica de MEV. Rodrigues e colaboradores (2017) relacionaram a circularidade das imagens obtidas por MEV dos filmes de polipirrol e o biomarcador do anticorpo p53 com amostras contendo o anticorpo p53. Os autores verificaram que houve uma deformação na morfologia dos filmes e a circularidade dos mesmos foi afetada, tornando-os irregulares. Desta forma, conseguiram quantificar as amostras contendo p53, um anticorpo marcador de câncer.

No presente trabalho, MEV foi utilizado para, inicialmente, obter informações acerca da morfologia dos filmes de PEI + HbAg, caracterizar estes filmes quando em contato com os metais pesados e avaliar a sensibilidade dos filmes de PEI+HbAg frente aos metais pesados, utilizando uma abordagem próxima à utilizada pelo grupo de pesquisa citado acima.

Os filmes foram preparados e recobertos com uma fina camada de Au (Ouro) para contato elétrico e geração da imagem. A camada de Au necessita ser fina o suficiente para não ser absorvida pela amostra, porém, espessa o suficiente para

manter o contato elétrico. Após o recobrimento, as amostras foram colocadas em uma câmara sob vácuo para eliminar a umidade.

A Figura 26 apresenta o eletrodo recoberto apenas com uma bicamada de PEI e HbAg, com aumento de 15 mil vezes. Na imagem, é possível observar que o eletrodo com apenas uma bicamada é extremamente poroso e o material não o recobre totalmente. Porém, observa-se que os componentes do filme não estão recobrindo todo o eletrodo, impossibilitando a possível interação do analito com a bicamada. Roz e colaboradores (2015) mostram que o crescimento dos filmes por LBL se dá a partir da formação inicial de conglomerados de filmes, como se fossem ilhas que, vão crescendo à medida que o material é depositado no eletrodo, até a cobertura total da superfície do eletrodo. Desta forma, é possível verificar que com apenas uma bicamada PEI/HbAg o eletrodo não está totalmente recoberto, corroborando com a literatura.

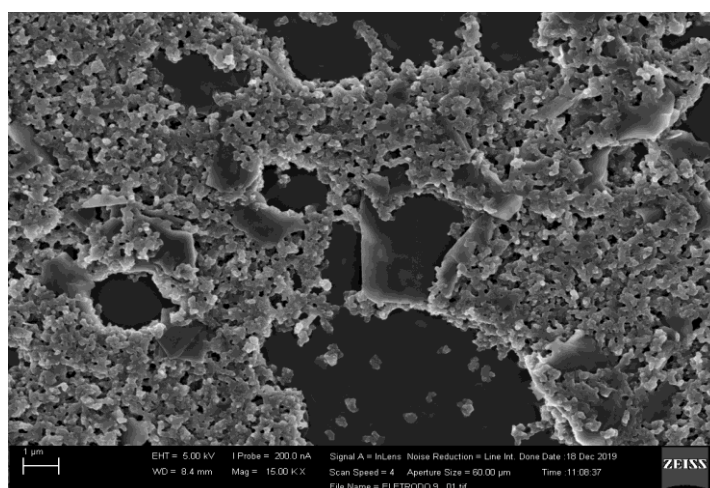


Figura 26. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) do Eletrodo com 1 bicamada de deposição do polímero PEI com a HbAg com aumento de 15 mil vezes.

Fonte: autor

Com base neste resultado, obteve-se imagens acerca do recobrimento apenas do PEI ao eletrodo. Estas imagens são utilizadas como base de comparação e estão apresentadas na Figura 27.

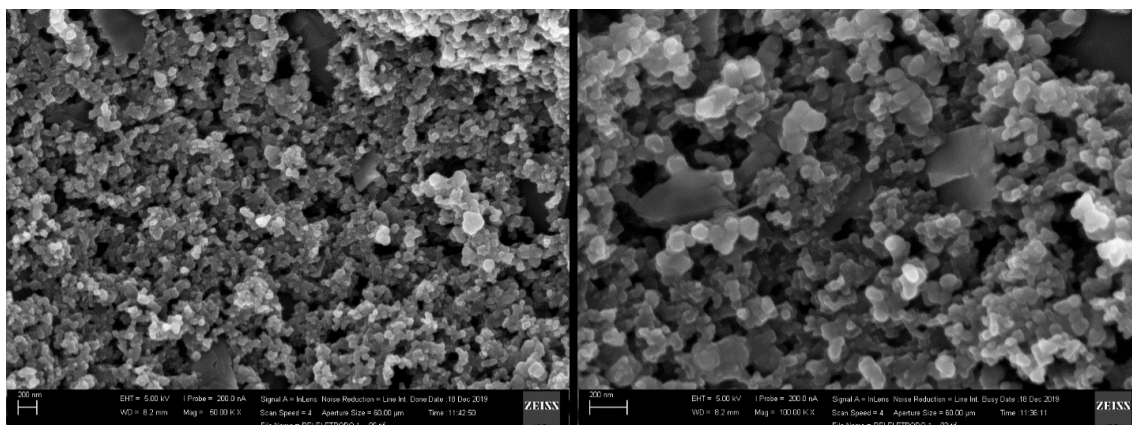


Figura 27. Imagem da deposição de 10 camadas do polímero PEI com aumento de 50 e 100 mil vezes (esquerda e direita, respectivamente).

Fonte: autor

Após observar as imagens referentes apenas ao PEI sobre o eletrodo, é constatado que há, ainda, muita irregularidade no crescimento do filme e ilhas não uniformes. Este fato pode ser relacionado à fraca interação entre as moléculas de PEI sobrepostas nas 10 bicamadas, perdendo estrutura em um determinado nível de deposição. Visto isso, a Figura 28 apresenta a imagem obtida por MEV-FEG da deposição de 10 bicamadas PEI/HbAg. Nela pode-se notar a maior uniformidade do filme frente às outras imagens apresentadas e, como esperado, uma interação mais coesa entre o polímero e a hemoglobina. Estas imagens são utilizadas como base de comparação para a possível identificação de alterações na morfologia deste filme frente aos metais analisados.

É possível visualizar a homogênea deposição do filme, de acordo com as limitações da técnica. Além disso, percebe-se também a porosidade das ilhas que fazem o analito permear e alcançar as moléculas ativas imobilizadas.

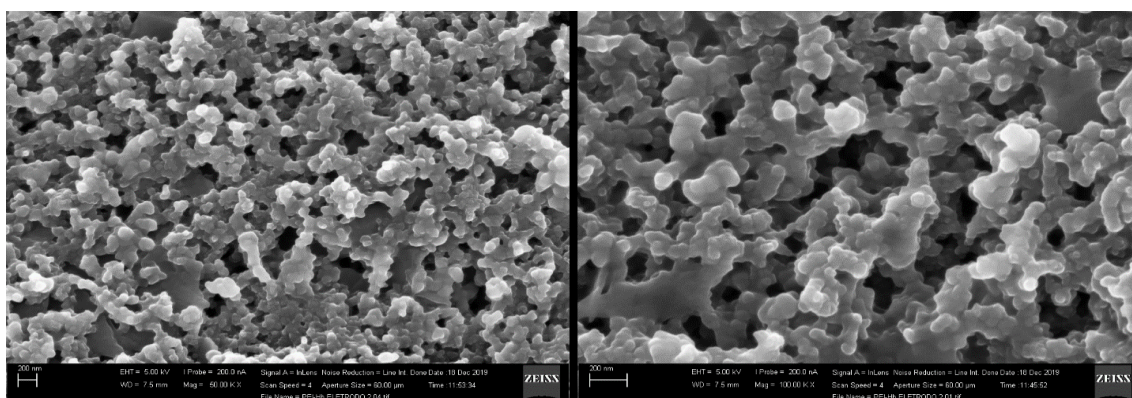


Figura 28. Imagem da deposição de 10 bicamadas PEI/HbAg sobre o eletrodo com aumento de 50 e 100 mil vezes (Esquerda e direita, respectivamente).

Fonte: autor

A partir destes resultados, foi realizada a interação das bicamadas PEI/HbAg com os metais cobre e cádmio em diferentes concentrações (4, 8 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e as imagens, quanto às morfologias estão apresentadas nas Figuras 29 e 30. As figuras têm aproximação das lentes de 50 e 100 mil vezes. Após a interação, é possível observar uma leve diminuição na circunferência dos nódulos das bicamadas em concentrações elevadas dos metais, o que pode nos dar indícios de que à medida que aumenta a concentração do metal a circunferência diminui.

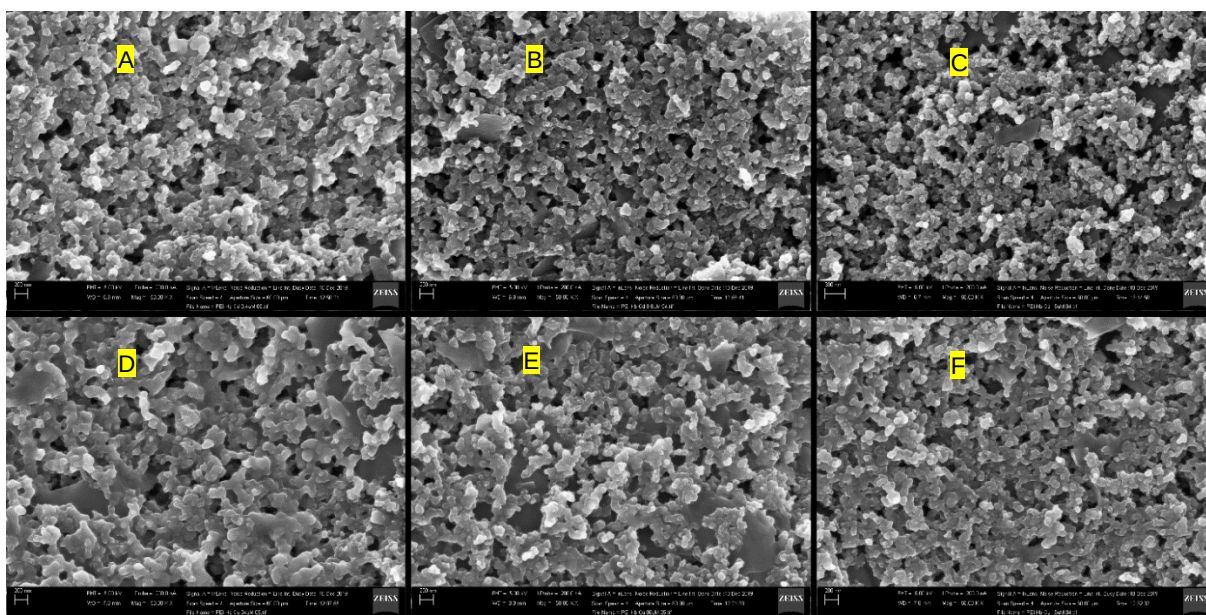


Figura 29. Imagens das interações dos metais com a os eletrodos nas concentrações de 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CdCl_2 (A), 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CdCl_2 (B), 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CdCl_2 (C), 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CuSO_4 (D), 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CuSO_4 (E) e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CuSO_4 (F) com 50 mil vezes de ampliação.

Fonte: autor

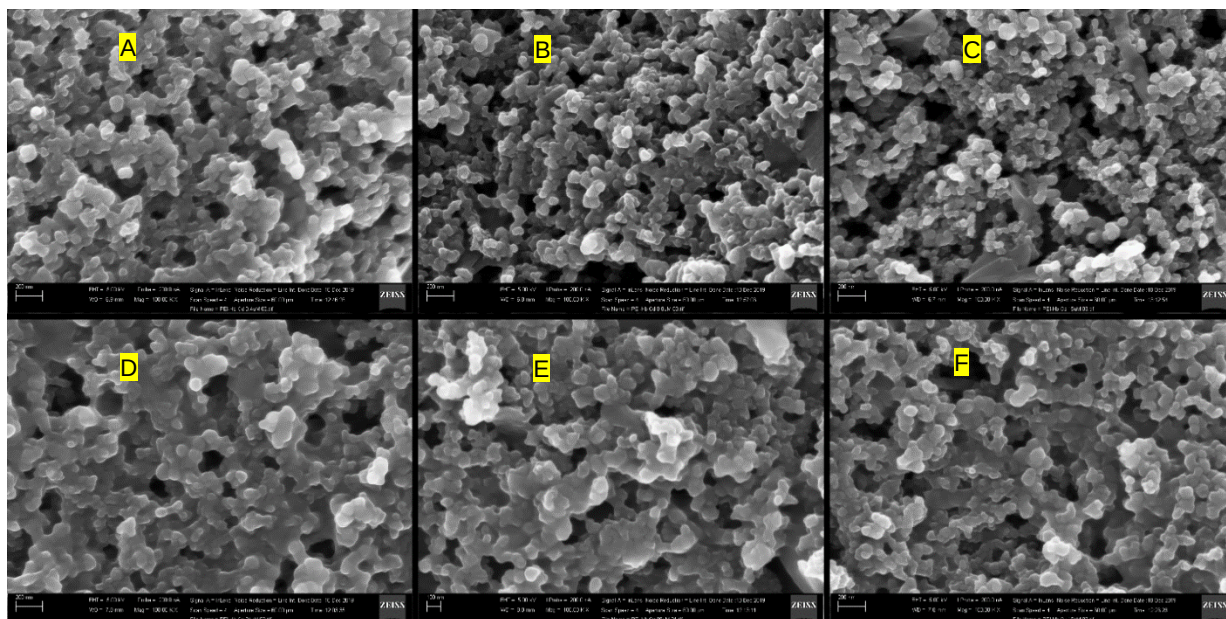


Figura 30. Imagens das interações dos metais com a os eletrodos nas concentrações de $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CdCl_2 (A), $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CdCl_2 (B), $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CdCl_2 (C), $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CuSO_4 (D), $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CuSO_4 (E) e $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CuSO_4 (F) com 100 mil vezes de ampliação.

Fonte: Autor

5.2.2 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)

A Figura 31 mostra a variação de frequência de ressonância a partir da deposição das bicamadas dos filmes PEI/HbAg sobre o eletrodo de ouro em cristal de quartzo da microbalança. Conforme foi observado, a frequência de ressonância diminui à medida que as bicamadas são depositadas, e, como há diminuição da frequência logo há aumento da massa. Assim, pode-se confirmar a adsorção da HbAg/PEI na superfície do eletrodo.

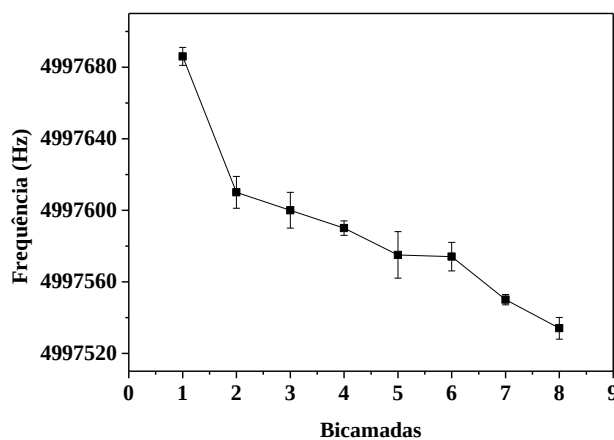


Figura 31. Variação da frequência de ressonância a partir da deposição de 8 bicamadas de PEI/HbAg na superfície do eletrodo de ouro da microbalança.

Fonte: autor

5.2.3 Voltametria cíclica das bicamadas de PEI/HbAg

A voltametria cíclica é uma técnica muito empregada em estudos sobre reações redox de espécies eletroativas, detecção de intermediários, velocidades de reação e acompanhamento de produtos formados em solução e sobre eletrodos (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007). Neste estudo, foi utilizada a voltametria cíclica para verificar o crescimento dos filmes PEI/HbAg nos eletrodos impressos de carbono (DRP-110) e para mensurar alterações redox da bicamada frente aos metais cádmio, cobre e zinco. Com isso foi possível verificar quais modificações estes metais podem promover no eletrodo recoberto pela amostra. Os filmes foram interagidos com concentrações crescentes de CuSO_4 , CdCl_2 e ZnSO_4 entre 0 e $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ e apresentaram uma redução na área do voltamograma devido ao acréscimo dos metais, com saturação em valores maiores que $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Para o crescimento dos filmes, o PEI, 1 g/L, foi utilizado de forma alternada nas camadas. Ao todo, dez bicamadas PEI/HbAg foram crescidas em eletrodo DRP-110 (Dropsens), conforme metodologia utilizada em trabalhos anteriores (SOUZA, 2018). A área dos filmes obtidos é normalizada, pois há uma redução das áreas à medida que os metais são adicionados, por isso é interessante normalizá-las para melhor visualização do resultado, como pode ser observado na Figura 32. Os voltamogramas dos filmes (-0,6v a +0,6v) foram obtidos conforme apresentado na Figura 32B e a integral de cada um é calculada com o auxílio do software OriginPro 8.5, obtendo então a área de cada voltamograma. Como a área é negativa, multiplica-se por (-1) e as áreas normalizadas são obtidas, como mostra a Figura 32A.

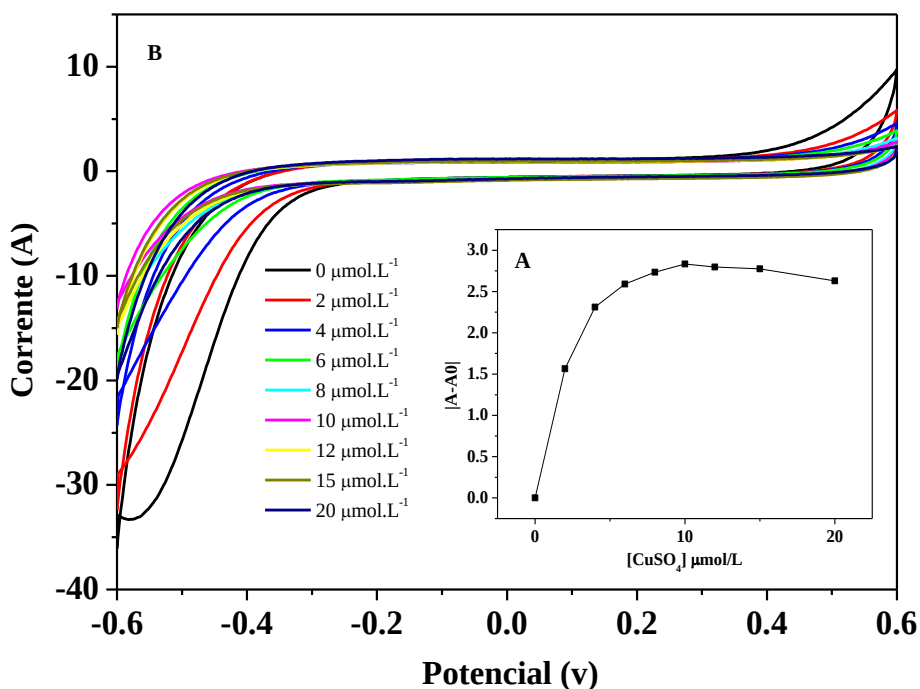


Figura 32 Voltamograma da bicamada PEI/HbAg. Exemplo de análise dos voltamogramas obtidos (A) Módulo da área dos voltamogramas de 10 bicamadas crescidas com PEI/HbAg interagidas com concentrações crescentes de Sulfato de cobre (0 a $70 \mu mol L^{-1}$). (B) Modelo representativo da redução da área dos voltamogramas de 10 bicamadas crescidas com PEI/HbAg interagidas com concentrações crescentes de cobre.

Fonte: autor

Na Figura 33, são mostrados os módulos das áreas normalizadas da interação dos metais cádmio, cobre e zinco com a HbAg, avaliados com concentrações crescentes de metal (0 a $70 \mu mol L^{-1}$). Foram utilizados como base estudos anteriores (SOUZA, 2018) em que o polímero poli(vinil sulfato de sódio), conhecido como PVS, foi empregado, para utilização enquanto material inerte aos metais utilizados, atuando como parâmetro de controle do experimento.

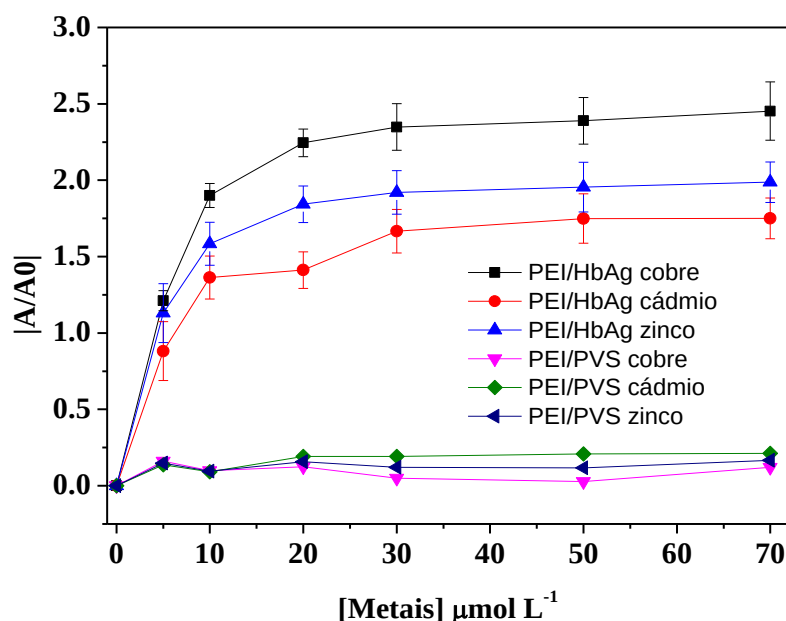


Figura 33. Módulos das áreas normalizadas dos voltamogramas das interações de cobre, cádmio e zinco com as bicamadas PEI/HbAg e PEI/PVS em concentrações crescentes dos metais (0 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e em sensores distintos. Monitorados por voltametria cíclica e tratados com o software OriginPro 8.5.

Fonte: autor

A inclinação das curvas referentes a interação dos filmes é mais acentuada entre os valores de 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, após este valor há uma maior saturação do sensor em todos os metais, além disso os metais não causaram nenhum efeito nas áreas dos sensores contendo PVS, conforme o esperado. Os ensaios de voltametria cíclica da bicamada PEI/HbAg mostrados acima sugeriram uma saturação do sensor em concentrações acima de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nos metais pesados analisados, pois não se observou alterações significativas no valor de A/A_0 acima de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metal. Esse tipo de comportamento linear caracteriza saturação do sensor, conforme apresentado por Rodrigues e colaboradores (2011) que elaboraram um biossensor para a detecção de ácido fólico.

Sabendo disso, na Figura 34, reduziu-se a escala de interação com metais afim de verificar com mais exatidão a região de saturação da curva e, por fim, delimitar a inclinação da reta, com o intuito de obter informações quantitativas acerca do sensor. Percebe-se que o comportamento é semelhante ao dos outros metais, mas, nesse caso, com saturação inferior a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do metal.

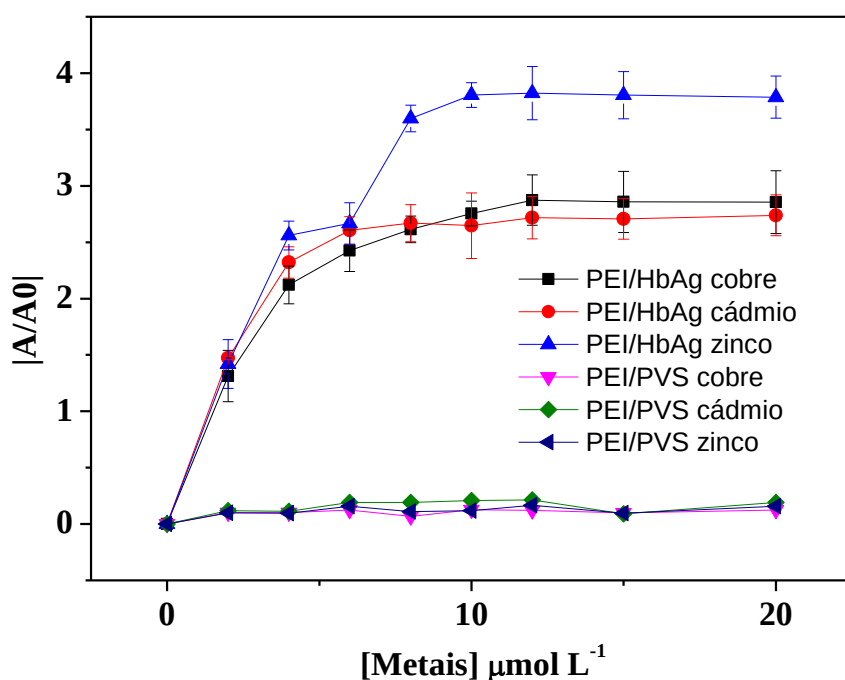


Figura 34. Módulos das áreas normalizadas dos voltamogramas das interações de cobre, cádmio e zinco com as bicamadas PEI/HbAg e PEI/PVS em concentrações crescentes dos metais (0 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e em sensores distintos, monitorados por voltametria cíclica e tratados com o software OriginPro 8.5.

Para comparação, realizou-se ensaios com a hemoglobina humana (HHb) nas mesmas condições descritas para a HbAg, e os resultados encontram-se na Figura 35. Pode-se observar que os estudos envolvendo a interação da hemoglobina humana com os metais pesados de interesse apresenta uma curva com inclinação menor, o que pode indicar uma menor sensibilidade aos metais. Isso pode ser associado ao fato da HHb já se encontrar parcialmente oxidada. Mas de qualquer forma, vale salientar que, tanto a HbAg quanto a HHb não são seletivas aos metais nos testes realizados.

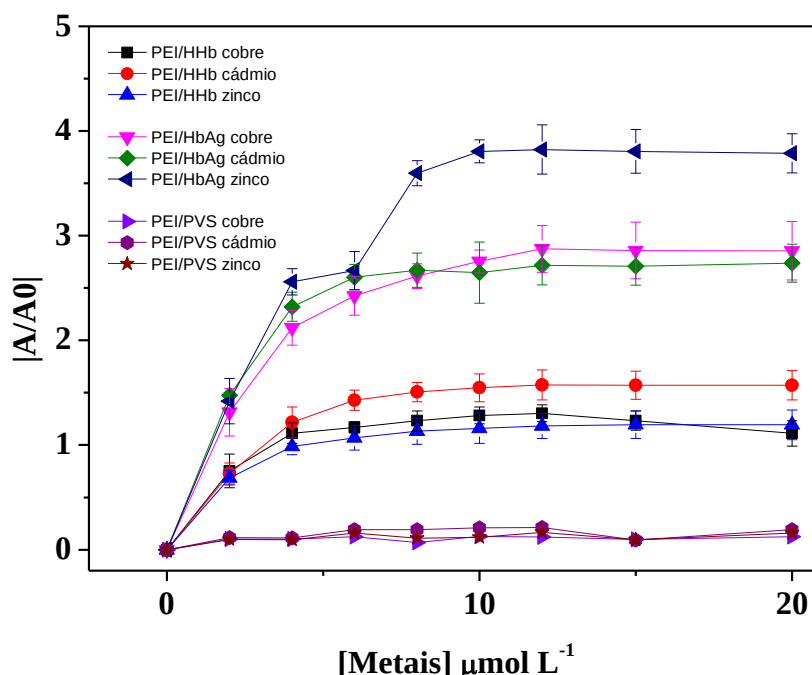


Figura 35. Módulos das áreas normalizadas dos voltamogramas das interações de cobre, cádmio e zinco com as bicamadas PEI/HHb, PEI/HbAg e PEI/PVS em concentrações crescentes dos metais (0 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e em sensores distintos, monitorados por voltametria cíclica e tratados com o software OriginPro 8.5.

Fonte: Autor

Em suma, pode-se observar, com base nos dados obtidos, que o sensor eletroquímico utilizando HbAg não é seletivo aos metais analisados. Há resposta linear, à medida que a concentração dos metais aumenta, porém, não é observada diferença significativa na inclinação das retas de cada amostra.

5.2.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) oferece detalhes das características elétricas da interface solução/eletrodo para alguns materiais. Esta técnica foi utilizada neste trabalho para possível caracterização elétrica dos filmes montados com HbAg e PEI, buscando estudar o comportamento elétrico disposto entre o analito e a bicamada PEI/HbAg imobilizada no eletrodo. Em outras palavras, buscou-se utilizar a técnica para verificar possíveis alterações na impedância à medida que as concentrações de sulfato de cobre aumentaram (foram adicionadas) nos eletrodos recobertos com a bicamada.

Alguns trabalhos publicados na literatura utilizam a técnica de EIE em biossensores de detecção eletroquímica. Soares e colaboradores (2019) mostraram que o biomarcador PCA3, específico para o câncer de próstata, pode ser detectado, dentre outras técnicas, por espectroscopia de Impedância Eletroquímica, em um teste mais efetivo que o utilizado atualmente, o teste de PSA (antígeno específico de

próstata). Neste trabalho, eles observaram que há variação na curva de impedância dos filmes LBL contendo quitosana, nanotubos de carbono e a fita de DNA complementar do PCA3 imobilizada no filme. Desta forma, quando há PCA3 no meio, ele se liga ao seu complementar e há uma variação positiva da impedância à medida que maiores concentrações do biomarcador é adicionada. Assim, os pesquisadores conseguiram quantificar a concentração de PCA3 na amostra.

Diante disso, a técnica EIE foi utilizada para verificar se há variação nas medidas de impedância nos filmes contendo PEI/HbAg quando postos em contato com concentrações crescentes de cobre e cádmio. Porém, as análises por EIE realizadas não tiveram resultados satisfatórios para os metais cobre e cádmio, como mostrado nas Figuras 36 e 37, respectivamente. Nelas, podem ser visualizadas as triplicatas de cada experimento e não é encontrada uniformidade nos dados, de modo a não ser possível verificar, por esta técnica, as alterações progressivas da impedância a partir da adição dos metais no eletrodo.

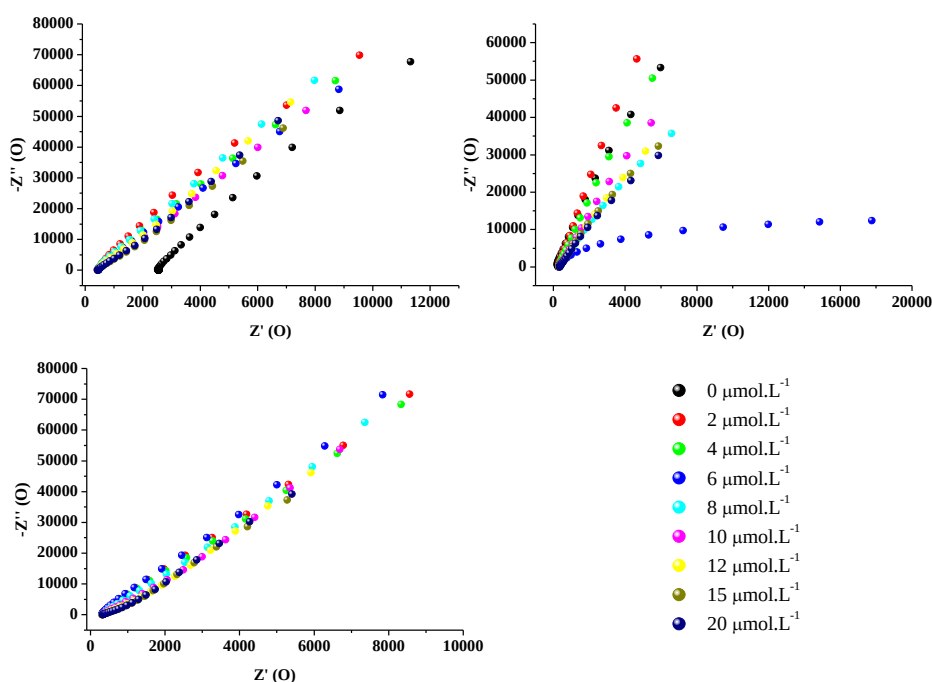


Figura 36. Impedância eletroquímica (Impedância real/imaginária) dos eletrodos montados com 10 bicamadas de PEI/HbAg na ausência e presença de concentrações crescentes de CuSO_4 . As medidas foram obtidas em um potenciostato/galvanostato Autolab PG STAT, 204 (Metrohm, Suíça) controlado pelo NOVA software.

Fonte: Autor

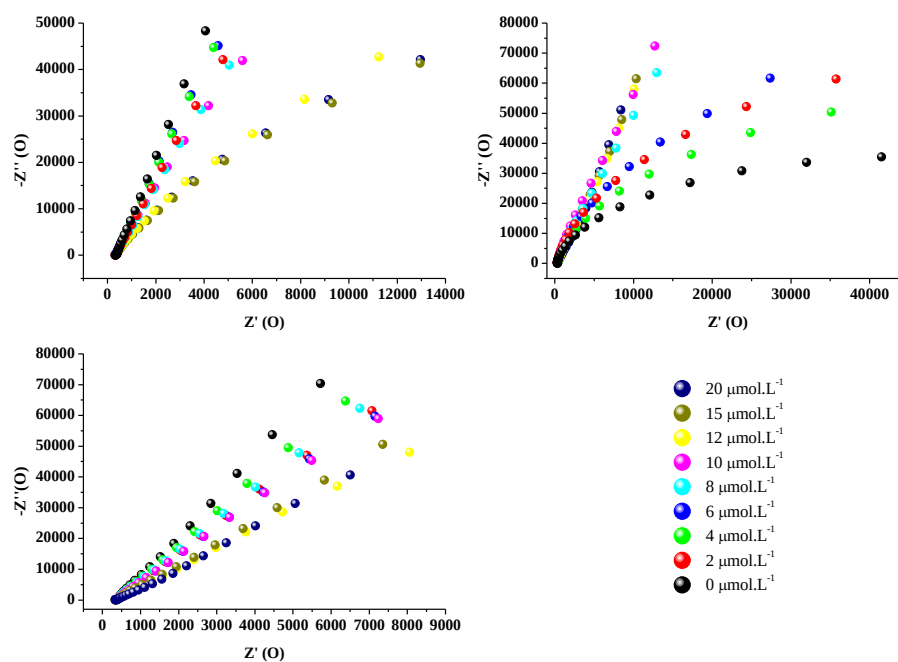


Figura 37. Impedância eletroquímica (Impedância real/imaginária) dos eletrodos montados com 10 bicamadas de PEI/HbAg na ausência e presença de concentrações crescentes de CdCl_2 . As medidas foram obtidas em um potenciostato/galvanostato Autolab PG STAT, 204 (Metrohm, Suíça) controlado pelo NOVA software.

Fonte: Autor

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, e de acordo com a literatura consultada, há a utilização de hemoglobinas na composição de biossensores, em muitos casos como transdutoras de elétrons, amplificando o sinal na detecção. Em contrapartida, a HbAg uma hemoglobina extracelular gigante, apresenta maior estabilidade oligomérica, maior resistência à oxidação e mais grupamentos heme do que as hemoglobinas (hemoglobina humana por exemplo) já utilizadas em sensores, tornando-a uma molécula de grande interesse biotecnológico.

Quanto aos ensaios espectroscópicos, a HbAg se mostrou eficiente na detecção do metal pesado cobre em solução, pois a oxidação é evidente. A hemoglobina sofre agregação com a adição de cobre acima de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de zinco acima de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. O metal cádmio não ocasiona oxidação ao grupo heme da HbAg, não provoca alterações na intensidade de espalhamento de luz da molécula e na emissão de fluorescência. O metal zinco oxida parcialmente, dissocia e causa agregação na HbAg em concentrações acima de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A utilização da HbAg como sensor ótico, tanto em solução quando imobilizada em quartzo, se mostrou eficiente. A HbAg é altamente sensível aos metais quando comparado a outros agentes caotrópicos como ureia e alguns surfactantes. Enquanto os estudos com ureia utilizam concentrações em mol L^{-1} para oxidar a proteína e os trabalhos com surfactantes utilizam concentrações na ordem de mmol/L , os resultados apresentados nesse trabalho são da ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$, evidenciando a sensibilidade que a HbAg apresenta para com estes metais.

A técnica de eletroforese monodimensional SDS-PAGE não tem a sensibilidade suficiente para a diferenciação das subunidades dissociadas pelos metais utilizados, sendo necessária a utilização de técnicas mais sensíveis como MALDI-TOF/MS.

Em se tratando da interação das bicamadas PEI/HbAg com cobre, monitorada por absorção ótica, observou-se que o tempo de interação da bicamada com o metal é importante para a verificação do deslocamento da banda de Soret da hemoglobina. Esta se desloca para valores próximos de 409 nm com 8 minutos de interação com a solução de $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CuSO_4 . Enquanto quando utilizamos tempos abaixo de 5 minutos de interação, a variação do deslocamento é menor, deslocando de 415 para 412 nm.

O crescimento dos filmes PEI/HbAg no eletrodo de carbono vítreo foi satisfatoriamente monitorado por voltametria cíclica, confirmando pelo aumento da massa através da microbalança de cristal de quartzo e pela morfologia característica observada através da Microscopia Eletrônica de Varredura. A interação das bicamadas PEI/HbAg com cobre, cádmio e zinco mostraram um comportamento semelhante, com saturação próxima a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ para todos os metais analisados no eletrodo de carbono vítreo, DRP110.

A técnica de impedância eletroquímica não pôde ser utilizada, pois não foi encontrada uniformidade nos dados, sem linearidade em alterações progressivas à medida que a concentração de metal aumenta. Por outro lado, a técnica de Microscopia eletrônica de varredura mostrou que há alterações na morfologia dos filmes à medida que os metais, cobre e cádmio, foram interagidos frente à bicamada PEI/HbAg e, posteriormente, será verificado se é possível utilizar esta técnica para indicar a presença destes metais nas soluções desconhecidas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante a execução deste estudo, foram obtidas informações importantes sobre a HbAg e sua interação com os metais cobre, cádmio e zinco. A molécula se mostrou sensível ao metal cobre quando imobilizada a um substrato sólido de quartzo com interação por 8 minutos, evidenciando sua grande potencialidade como um biossensor ótico. Desta forma, para futuros trabalhos, será importante elucidar a interação desta molécula utilizando um tempo de interação maior com o metal.

Além disso, as técnicas que aqui foram utilizadas para caracterização dos filmes podem ser utilizadas para possível detecção dos metais, como é o caso do MEV e da MECQ. Para os estudos com o MEV, a circularidade dos complexos PEI/HbAg, através de software de aprendizado de máquina, pode ser medida para confirmar se elas realmente diminuem com a adição dos metais analisados. Já para a MECQ, a adição dos metais monitorada nas bicamadas de PEI/HbAg e monitoradas pela microbalança pode ser uma outra forma de quantificar e, assim, fazer um biossensor mais completo.

Com relação a estrutura da HbAg, outros estudos precisam ser realizados para confirmar as alterações em sua estrutura na presença de cobre e zinco, tais como dicroísmo circular e DLS, além da utilização do MALDI-TOF-MS para verificar se a massa da HbAg e suas subunidades sofrem alterações significativas.

8.REFERÊNCIAS

- ADATI, M. C.; RIBEIRO, Á. DA S. **Monitoramento pós-mercado dos testes rápidos para COVID-19: enfrentamento da pandemia**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- AGUSTINHO, S. C. M. et al. Spectroscopic studies of the met form of the extracellular hemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1298, n. 2, p. 148–158, 1996.
- AGUSTINHO, S. C. M. et al. Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in met form obtained from Sephadex gel filtration. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 118, n. 1, p. 171–181, 1997.
- ALIX, P. et al. Adding the oxygen carrier M101 to a cold-storage solution could be an alternative to HOPE for liver graft preservation. **JHEP Reports**, v. 2, n. 4, p. 100119, 2020.
- ALVAREZ-CARREÑO, C.; BECERRA, A.; LAZCANO, A. Molecular Evolution of the Oxygen-Binding Hemerythrin Domain. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157904, 23 jun. 2016.
- ANDRÉA, M. M. DE. O Uso De Minhocas Como Bioindicadores De Contaminação De Solos. **Número Especial**, v. 2, n. 2, p. 95–107, 2010.
- ANFOSSI, L. et al. Increased sensitivity of lateral flow immunoassay for ochratoxin A through silver enhancement. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 30, p. 9859–9867, 2013.
- AXELROD, T.; ELTZOV, E.; MARKS, R. S. Capture-Layer Lateral Flow Immunoassay: A New Platform Validated in the Detection and Quantification of Dengue NS1. **ACS Omega**, v. 5, n. 18, p. 10433–10440, 2020.
- BACHEGA, J. F. R. **Estrutura cristalográfica da hemoglobina gigante de *Glossoscolex paulistus*, um complexo de 3,6 mega Daltons**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 3 jun. 2013.
- BACHEGA, J. F. R. et al. The structure of the giant haemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 71, p. 1257–1271, 2015.
- BARROCAS, P. R. G. et al. Biosensors to monitor the exposition to environmental pollutants. **Cad. Saúde Colet.**, v. 16, n. 4, p. 677–700, 2008.
- BARROS, A. E. B. et al. Denaturant effects on HbGp hemoglobin as monitored by 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) probe. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 327–336, 2015.
- BARROS, A. E. B. et al. Characterization of the apo-form of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) and its stability in the presence of urea. **European Biophysics Journal**, v. 49, p. 449–462, 2020.
- BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. **Minhocas na América Latina: biodiversidade e ecologia**. 1ª ed. Londrina: Embrapa Soja, 2007.
- BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados**. 3ª ed. Rio de Janeiro:

Guanabara Koogan, 2018. v. 53

CALISI, A. et al. Effect of heavy metal exposure on blood haemoglobin concentration and methemoglobin percentage in *Lumbricus terrestris*. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 847–854, 22 jun. 2011.

CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1 ed ed. São Carlos: Artliber Editora Ltda., 2003.

CARVALHO, F. A. O. et al. Molecular masses and sedimentation coefficients of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Alkaline oligomeric dissociation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 183–193, 2011.

CARVALHO, F. A. O. et al. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, n. 1, p. 340–348, 2013a.

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.

CARVALHO, J. W. P. et al. Sodium dodecyl sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561–570, 2013b.

CICHA, I. et al. Biosensor-Integrated Drug Delivery Systems as New Materials for Biomedical Applications. **Biomolecules**, v. 12, n. 9, p. 1198, 29 ago. 2022.

COATES, C. J.; DECKER, H. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 2, p. 293–317, 12 jan. 2017.

COSTA-PAIVA, E. M.; COATES, C. J. Recent Insights into the Diversity and Evolution of Invertebrate Hemerythrins and Extracellular Globins. In: HARRIS, J. R. (Ed.). **Subcellular Biochemistry**. [s.l.] Springer, 2020. v. 94p. 251–273.

CRUZ RODRIGUES, V. et al. Polypyrrole/phytase amperometric biosensors for the determination of phytic acid in standard solutions. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 160, n. 1, p. 222–226, 2011.

DAMBORSKÝ, P.; ŠVITEL, J.; KATRLÍK, J. Optical biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 91–100, 2016.

DE SILVA, P. M. C. S. et al. Chlorpyrifos causes decreased organic matter decomposition by suppressing earthworm and termite communities in tropical soil. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 10, p. 3041–3047, 1 out. 2010.

DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232–1237, 1997.

DINCER, C. et al. Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring. **Advanced Materials**, v. 31, n. 30, p. 28, 15 maio 2019.

DOS SANTOS PEREIRA, T. et al. Use of zein microspheres to anchor carbon black and hemoglobin in electrochemical biosensors to detect hydrogen peroxide in cosmetic products, food and biological fluids. **Talanta**, v. 194, p. 737–744, mar. 2019.

ELLAIRAJA, S. et al. A green and facile approach for synthesizing imine to develop optical biosensor for wide range detection of bilirubin in human biofluids. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 82–88, 15 maio 2017.

ENDO, W. B. I. et al. **Biosensing for the 21st Century**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 109

GIL, E. DE S.; DE MELO, G. R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 375–391, 2010.

GILLES-GONZALEZ, M. A et al. Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. **Biochemistry**, v. 33, n. 26, p. 8067–73, 1994.

GREEN ETXABE, A. et al. Identifying conserved polychaete molecular markers of metal exposure: Comparative analyses using the *Alitta virens* (Annelida, Lophotrochozoa) transcriptome. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 240, n. August 2020, p. 108913, 2021.

HAJIAN, A. et al. Nanomolar detection of methylparaben by a cost-effective hemoglobin-based biosensor. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 122–127, 2016.

HARNOIS, T. et al. High-level Production of Recombinant Arenicola Marina Globin Chains in Escherichia Coli: A New Generation of Blood Substitute. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 106–116, 2009.

HOLDE, K. E. VAN; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. **Principles of Physical Biochemistry Principles of Physical Biochemistry**. 2 ed. ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education Inc., 2006.

IMASATO, H. et al. Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* obtained by gel filtration. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 118, n. 1, p. 171–181, 1997.

JEFFREY, M. I.; ZHENG, J.; RITCHIE, I. M. The development of a rotating electrochemical quartz crystal microbalance for the study of leaching and deposition of metals. **Measurement Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 560–567, 2000.

JÚLIO DORNAS OLIVEIRA NAZARETH, J. DE et al. BIOSSENSOR: UMA EVOLUÇÃO BIOTECNOLÓGICA NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DO CÂNCER BIOSSENSOR, A BIOTECHNOLOGICAL EVOLUTION TO DIAGNOSE CANCER. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, v. 34, n. 1, p. 61–68, 2021.

JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 36–60, 2016.

KABIR, M. A. et al. Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. **Biosensors**, v. 11, n. 7, p. 206, 23 jun. 2021.

KOCZULA, K. M.; GALLOTTA, A. Lateral flow assays. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 111–120, 30 jun. 2016.

LAGHLIMI, C. et al. Recent advances in electrochemical sensors and biosensors for monitoring drugs and metabolites in pharmaceutical and biological samples. **ADMET and DMPK**, v. 11, n. 2, p. 151–173, 1 maio 2023.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3th. ed. Boston, MA: Springer US, 2006.

LVOV, Y. et al. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 22, p. 6117–6123, 1995.

MANWELL, C. Comparative Physiology: Blood Pigments. **Annual Review of Physiology**, v. 22, n. 1, p. 191–244, 28 mar. 1960.

MARMO MOREIRA, L. et al. Pentacoordinate and hexacoordinate ferric hemes in acid medium: EPR, UV-Vis and CD studies of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. **Biophysical Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 62–72, 2006.

MCCOMBS, N. L. et al. Interaction of Azole-Based Environmental Pollutants with the Coelomic Hemoglobin from *Amphitrite ornata*: A Molecular Basis for Toxicity. **Biochemistry**, v. 56, n. 17, p. 2294–2303, 2 maio 2017.

MD MUSLIM, N. Z. et al. Optical biosensor test strip for the screening and direct determination of l-glutamate in food samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 161, n. 1, p. 493–497, 3 jan. 2012.

MERLIM, A. D. O. et al. Soil macrofauna in cover crops of figs grown under organic management. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 57–61, 2005.

MOREIRA, L. M. et al. Hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*: um extraordinário sistema supramolecular hemoproteico. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 119–130, 2011.

MUZZELO, C. et al. Prolonging the shelf life of *Lumbricus terrestris* erythrocrurin for use as a novel blood substitute. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 39–46, 2 jan. 2018.

NASCIMENTO, E. D. et al. 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.

NEAVE, M. J. et al. The transcriptome and proteome are altered in marine polychaetes (Annelida) exposed to elevated metal levels. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2721–2735, maio 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6th. ed. New York: [s.n.].

NIGAM, V. K.; SHUKLA, P. Enzyme Based Biosensors for Detection of Environmental Pollutants-A Review. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1773–1781, 28 nov. 2015.

NNACHI, R. C. et al. Biosensors for rapid detection of bacterial pathogens in water, food and environment. **Environment International**, v. 166, p. 107357, 1 ago. 2022.

NOMURA, T.; IJIMA, M. Electrolytic determination of nanomolar concentrations of silver in solution with a piezoelectric quartz crystal. **Analytica Chimica Acta**, v. 131,

n. C, p. 97–102, 1 nov. 1981.

OLIVEIRA, J. B. S. et al. Initial biophysical characterization of *Amyntas gracilis* giant extracellular hemoglobin (HbAg). **European Biophysics Journal**, v. 49, n. 6, p. 473–484, 2020.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. ed. Bellingham, Washington: Cengage Learning, 2010. v. 1

POLI, A. L. **Auto-Oxidação da Hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*: Efeito do pH, do Cianeto e do Surfactante Aniônico SDS**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.

POLI, A. L. et al. SDS (sodium dodecyl sulfate) effect on the autoxidation of the *Glossoscolex paulistus* giant extracellular hemoglobin: Kinetic studies at pH 7.0 and 9.0. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 1, p. 96–104, set. 2006.

POZY, E.; SAVLA, C.; PALMER, A. F. Photocatalytic Synthesis of a Polydopamine-Coated Acellular Mega-Hemoglobin as a Potential Oxygen Therapeutic with Antioxidant Properties. **Biomacromolecules**, v. 24, n. 5, p. 2022–2029, 8 maio 2023.

PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. J. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. **Sensors (Switzerland)**, v. 13, n. 4, p. 4811–4840, 2013.

RAMOS, L. **Estudos biofísicos da Hemoproteína extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) na ausência e na presença de surfactantes**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2017.

RAMOS, L. **ESTUDOS BIOFÍSICOS DA HEMOCIANINA DO CAMARÃO *Macrobrachium acanthurus* (HMAC) NA PRESENÇA DE AGENTES CAOTRÓPICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2022.

RIBELATTO, J. C. et al. Estudo espectroscópico do equilíbrio entre espécies hexacoordenada e pentacoordenada do monômero nativo e reconstituído da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* em meio alcalino. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 666–673, 2006.

RODRIGUES, V. DA C. et al. 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.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chem Soc Rev**, v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 2010.

ROUSSELOT, M. et al. Arenicola marina extracellular hemoglobin: A new promising blood substitute. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 3, p. 333–345, 2006.

ROYER, W. E.; OMARTIAN, M. N.; KNAPP, J. E. Low Resolution Crystal Structure of *Arenicola Erythrocytorin*: Influence of Coiled Coils on the Architecture of a Megadalton Respiratory Protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 365, n. 1, p. 226–236, 2007.

RÓZ, A. L. DA et al. **Nanoestruturas - Princípios e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro:

Elsevier, 2015. v. 1

SANTIAGO, P. S. et al. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* Hemoglobin (HbGp) upon interaction with cethyltrimethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants: Dissociation of oligomeric structure and autoxidation. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, n. 4, p. 506–517, 2007.

SANTIAGO, P. S. et al. 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, mar. 2008.

SEBASTIÃO, I. **Estudos moleculares e caracterização biofísica da hemoglobina de *Amyntas gracilis* (HbAg)**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2022.

SILVEIRA, L. T. **Estudo Eletroquímico da interação do citocromo c com líquidos iônicos em diferentes substratos para aplicação em biossensores**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

SINGH, A. et al. Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. **Biosensors**, v. 11, n. 9, p. 336, 14 set. 2021.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6 ed. ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007.

SOARES, J. C. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 14 fev. 2011.

SOARES, J. C. et al. Detection of the Prostate Cancer Biomarker PCA3 with Electrochemical and Impedance-Based Biosensors. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 50, p. 46645–46650, 2019.

SOARES, K. W. P.; MARIANO, W. DOS S.; PAULINO, M. G. Teste de fuga com minhocas (*Eisenia andrei*) em solo natural tratado com biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* para avaliação da qualidade do solo. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e423985774, 11 jul. 2020.

SOLOMON, E. I.; BALDWIN, M. J.; LOWERY, M. D. Electronic Structures of Active Sites in Copper Proteins: Contributions to Reactivity. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 4, p. 521–542, 1 fev. 1992.

SOUZA, C. O. **Caracterização e imobilização da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* em substrato sólido visando a elaboração de biossensores de contaminação ambiental**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Química, 2018.

SOUZA, T. T. L.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M. Use of hemoglobin as alternative to peroxidases in cholesterol amperometric biosensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 178, p. 101–106, 2013.

STEFFEN, G. P. K. et al. Importância ecológica e ambiental das minhocas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 137–147, 2013.

STOEVA, S. et al. *Penaeus monodon* (tiger shrimp) hemocyanin: subunit composition and thermostability. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 56, n. 5–6, p. 416–422, 2001.

SUMITHA, M. S.; XAVIER, T. S. Recent advances in electrochemical biosensors – A brief review. **Hybrid Advances**, v. 2, p. 100023, 1 abr. 2023.

TABAK, M. et al. Recent New Characterizations on the Giant Extracellular Hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* and Some Other Giant Hemoglobins from Different Worms. In: **Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine**. [s.l.] InTech, 2012. p. 376.

TAMÁS, M. et al. Heavy Metals and Metalloids As a Cause for Protein Misfolding and Aggregation. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 252–267, 2014.

TAME, J. R. H.; VALLONE, B. The structures of deoxy human haemoglobin and the mutant Hb Tyr α 42His at 120 K. **urn:issn:0907-4449**, v. 56, n. 7, p. 805–811, 1 jul. 2000.

UNIYAL, A. et al. Recent Advances in Optical Biosensors for Sensing Applications: a Review. **Plasmonics**, v. 18, n. 2, p. 735–750, 1 abr. 2023.

VAMPRÉ, T. M.; FUCCILLO, R.; ANDRÉA, M. M. DE. OLIGOQUETA Eisenia andrei COMO BIOINDICADOR DE CONTAMINAÇÃO DE SOLO POR HEXACLOROBENZENO. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 59–66, 2010.

VAMVAKAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. A. Pesticide detection with a liposome-based nano-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 12, p. 2848–2853, 2007.

VAN HOLDE, K. E.; MILLER, K. I.; DECKER, H. Hemocyanins and Invertebrate Evolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15563–15566, 11 maio 2001.

VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Técnicas in situ de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 664–679, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4th. ed. Porto Alegre: [s.n.].

WANG, C. et al. A nitrite and hydrogen peroxide sensor based on Hb adsorbed on Au nanorods and graphene oxide coated by polydopamine. **Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 758–765, 2014.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 2 ed. ed. New York: Wiley-VCH, 2000.

XAVIER, M. P. et al. Fiber optic monitoring of carbamate pesticides using porous glass with covalently bound chlorophenol red. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, n. 12, p. 895–905, 2000.

XING, G. et al. New Advances in Lateral Flow Immunoassay (LFI) Technology for Food Safety Detection. **Molecules**, v. 27, n. 19, 2022.

YADAV, R. et al. Heavy metal toxicity in earthworms and its environmental implications: A review. **Environmental Advances**, v. 12, n. May, p. 100374, 2023.

ZIMMERMAN, D. et al. Direct comparison of oligochaete erythrocruorins as potential blood substitutes. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 2, n. 2, p. 212–221, 2017.