

CLAUDEMIR OLIVEIRA SOUZA

**Caracterização e imobilização da hemoglobina extracelular de
Amyntas gracilis em substrato sólido visando a elaboração de
biossensores de contaminação ambiental.**

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

Orientador: Profª Dra. Patrícia Soares Santiago

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S719c Souza, Claudemir Oliveira
Caracterização e imobilização da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* em substrato sólido visando a elaboração de biossensores de contaminação ambiental / Claudemir Oliveira Souza. – Araraquara : [s.n.], 2018
69 f. : il.

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

1. Hemoglobina. 2. Biossensores. 3. Metais pesados. 4. Biopolímeros. 5. Solos - Poluição. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Caracterização e imobilização da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* em substrato sólido visando a elaboração de biossensores de contaminação ambiental"

AUTOR: CLAUDEMIR OLIVEIRA SOUZA

ORIENTADORA: PATRICIA SOARES SANTIAGO

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



Prof^a. Dr^a. PATRICIA SOARES SANTIAGO

Campus Experimental de Registro / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro



Prof^a. Dr^a. MARLI LEITE DE MORAES

Departamento de Ciência e Tecnologia / Universidade Federal De São Paulo - UNIFESP - São José dos Campos.



Dr^a VALQUIRIA DA CRUZ RODRIGUES BARIOTO

Escola de Engenharia de São Carlos / Universidade de São Paulo - USP - São Carlos

Araraquara, 09 de março de 2018

Dedico este trabalho aos meus pais, familiares e
amigos que sempre me apoiaram em momentos
difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as coisas boas que surgiram em minha vida, inclusive a oportunidade da pós-graduação.

Aos meus pais Alzeni e Ademir, e a toda família por estarem presentes a todo tempo e me apoiarem incondicionalmente.

À minha orientadora Patrícia Santiago pela orientação, paciência, atenção e oportunidade de trabalhar.

À professora Marli Moraes pela orientação nas medidas voltamétricas e todo o conhecimento transmitido.

Ao grupo de pesquisa Biomoléculas pelas valiosas discussões e apoio.

Ao pessoal da República Etanóis de Matão, irmãos que sempre estarão comigo na vida!

Aos professores do IFSP por toda a ajuda na formação acadêmica e pessoal, em especial aos professores Felipe, Alécio, Márcia, Kelly, Jú, Jean e Cestari.

À Josi, que sempre ouvia meus choros e lamentações e estava ali pra me ajudar em tudo. Você foi mais que uma amiga, foi um presente de Deus!

Aos amigos que fiz em Registro, colegas do laboratório Lierge, Jonathan, Birita, Raissa, Raphael, Gustavo, Luana, Camila, Isis e a todos que me receberam muito bem.

Ao Felipe Marengo, Fábio Marengo e Ananisa Marengo pela amizade e apoio em São José dos Campos.

Aos meus amigos de Vinhedo que me apoiaram e me levaram pra beber tantas vezes pra conversar.

As funcionárias da STPG de Araraquara pelo apoio e ajuda sempre que precisei.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP pelo apoio financeiro na execução deste projeto.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia pelo apoio e oportunidades dadas aos alunos.

“Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças”

Stephen Hawking

RESUMO

As hemoproteínas desempenham um papel vital nos organismos. Dentre elas, as hemoglobinas extracelulares gigantes (Hbs) se destacam por sua alta cooperatividade, alta estabilidade oligomérica, grande afinidade para ligação com oxigênio e resistência à oxidação. Devido estas propriedades, as Hbs apresentam um grande potencial biotecnológico, como é o caso de estudos buscando protótipos de substituição sanguínea e elaboração de biossensores. Porém, o uso das hemoglobinas gigantes em biossensores para detecção de metais pesados ainda não é encontrado na literatura, este tipo de biossensor agiliza e diminui o custo das análises de empresas e agências de fiscalização ambiental, obtendo o resultado *in loco*. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a sensibilidade da hemoglobina de *Amyntas gracilis* (HbAg) com os metais cobre e cádmio em diferentes valores de pH e imobilizá-la em substrato sólido com o auxílio dos seguintes polímeros: o catiônico polietilenoimina (PEI) e o aniônico hidrocloreto de polialilamina (PAH). Os estudos por absorção ótica, espalhamento de luz (LSI), dicroísmo circular (CD) e fluorescência da interação da HbAg em função da concentração do metal pesado cobre no pH 7,0 mostraram que a concentração de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ é uma concentração crítica onde observa-se uma maior oxidação do grupo heme, agregação e dissociação da proteína, além de alteração em suas α -hélices. No pH 5,0 foi observada oxidação do grupo heme mas sem alterações nas estruturas secundárias da HbAg e formação de agregados. As análises dos espectros de absorção ótica, CD, fluorescência e LSI da HbAg na presença de diferentes concentrações do metal pesado cádmio não apresentaram mudanças significativas quando comparadas com o espectro da HbAg nativa. A imobilização da HbAg em PEI no pH 7,0 foi monitorada por absorção ótica e voltametria cíclica, entretanto a HbAg não foi possível imobilizar a HbAg no polímero PAH no mesmo valor de pH, sugerindo que a interação da HbAg com os biopolímeros se deve por interações eletrostáticas. A imobilização da HbAg em PEI manteve as características da hemoglobina em pH 7,0. A hemoglobina apresentou respostas ao cobre nas medidas de voltametria cíclica realizadas em concentrações de até $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do metal, evidenciando o grande potencial de biossensoriamento do sensor fabricado. Assim, nestes estudos foi possível verificar que a HbAg na presença de cobre em pH 7,0 se oxida, agrega e dissocia, enquanto que em pH 5,0 ela apresenta apenas oxidação. Na presença de cádmio, a HbAg não apresentou nenhuma alteração através das técnicas avaliadas. Com isso, sugere-se que a HbAg pode ser utilizada como um biossensor de indicação de presença de concentrações micromolares do metal pesado cobre.

Palavras-chave: Hemoglobina. Biossensores. Metais pesados.

ABSTRACT

Hemoproteins are a group of proteins that play a vital role in organisms. Among them, giant extracellular hemoglobins (Hbs) stand out for their high cooperativity, high oligomeric stability, high affinity for oxygen binding and resistance to oxidation. Due to these properties, the Hbs show a great biotechnological potential, as is the case of studies searching for prototypes of blood replacement and preparation of biosensors. However, the use of giant hemoglobins in biosensors for heavy metals detection is not yet reported on the literature, this kind of biosensors speeds up and lowers costs of analysis of companies and environmental inspection agencies, obtaining on the spot result. Thus, the aim of this work was verified the sensibility of HbAg with the metals copper and cadmium on different pH values and it's immobilization in solid surfaces with the polymers: the cationic polietilenimine (PEI) and anionic polyallylamine hydrochloride (PAH). Studies of optical absorption (UV-Vis), light scattering (LSI), circular dichroism (CD) and fluorescence of HbAg interaction with copper at pH 7.0 shown that $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ it's a critical concentration where observed a great oxidation of group heme, aggregation and protein dissociation as well as alteration on your α -hélices. In pH 5.0 was observed oxidation of heme group but without alterations in HbAg secondary structure and no aggregates formation. UV-Vis spectra analysis, CD, fluorescence and LSI of HbAg at different concentrations of cadmium doesn't shown significant changes on native HbAg spectra. The HbAg immobilization on PEI pH 7,0 has monitored by optical absorption and cyclic voltammetry, however it was not possible to immobilize the HbAg in the PAH polymer at the same pH value, suggesting that HbAg interaction with biopolymers is due to electrostatic ligations. The HbAg Immobilization in PEI maintained the hemoglobin characteristics at pH 7.0. The Hemoglobin shown responses to copper at concentrations of up to $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ of the metal in cyclic voltammetry measurements performed, demonstrated the great potential of the fabricated biosensor. Thus, in these studies it was possible to verify that HbAg on copper presence at pH 7.0 oxidizes, to aggregates and dissociates whereas at pH 5.0 it presents only oxidation. In the presence of cadmium, the HbAg showed no change through the techniques evaluated. Thereby, it is suggested that HbAg can be used as a biosensor indicating the presence of micromolar concentrations of copper heavy metal.

Keywords: Hemoglobin. Biosensors. Heavy metals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Representação do sítio de ligação de O ₂ no grupo heme. (B) Estrutura da hemoglobina humana com destaque para os grupos hemes em vermelho e as cadeias α e β .	14
Figura 2. Representação esquemática no arranjo oligomérico de HbGp, na sua estrutura nativa, obtida a partir de dados cristalográficos. A HbGp é uma bicamada hexagonal com 12 protômeros, sendo 144 cadeias globinas e 36 estruturas denominadas linkers. Ao todo são 144 cadeias de globinas e 36 estruturas tipo linkers.	16
Figura 3. Estrutura quaternária da hemoglobina humana. Dissociação da hemoglobina quando posta em solução concentrada de uréia, o tetrâmero se dissocia em dímeros $\alpha\beta$.	18
Figura 4. Representação da estrutura de uma proteína em sua forma nativa e após a desnaturação.	19
Figura 5. Modelo de um biossensor de reconhecimento molecular, o analito é específico ao sistema de reconhecimento. Após a ligação, o transdutor eletrônico emite um sinal para um detector.	21
Figura 6. Foto do anelídeo <i>Amyntas gracilis</i> no momento da extração da hemolinfa.	25
Figura 7. Cromatograma da HbAg 25 mg.mL ⁻¹ obtido em uma coluna Superdex-200 10/300 GL, equilibrada em tampão Tris-HCl 100 mmolL ⁻¹ pH 7,0 a 25°C, utilizando um cromatógrafo AKTA Pure M (GE) com coluna Superdex G-200.	26
Figura 8. Diagrama de Jablonsk. (1) Absorção de radiação ($S_0 \rightarrow S_1$), (2) Emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$), (3) Conversão interna e relaxação vibracional ($S_1 \rightarrow S_0$), (4) Cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$), (5) Emissão de fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0$).	29
Figura 9. (A) Componente a direita (R) e a esquerda (L) de uma radiação circularmente polarizada: (I) as duas componentes possuem a mesma amplitude; (II) as duas componentes possuem amplitudes diferentes que resultam em uma polarização elíptica. (B) relação dentre a absorbância e espectro de CD. Na banda 1 ocorre maior absorção L que R, em 2 maior absorção em R que L, em 3 a absorção em R e L são iguais.	31
Figura 10. Espectros de CD no UV associados a vários tipos de estrutura: (traço e ponto) α -hélices, (traços) folhas- β e (linha cheia) estruturas aleatórias.	32
Figura 11. (a) Curva potencial vs. tempo e (b) voltamograma cíclico para uma solução de K ₃ Fe(CN) ₆ 6 mmolL ⁻¹ e KNO ₃ 1 molL ⁻¹ .	34
Figura 12. (A) Representação esquemática da deposição dos polieletrólitos no substrato. Passos 1 e 2 mostram a adsorção do poliânion e 3 e 4 do policátion. (B) Ilustração molecular básica da adsorção dos polieletrólitos.	35
Figura 13. Fórmulas estruturais de (A) hidrocloreto de polialilamina (PAH); (B) polietilenoimina (PEI) e (C) ácido poli(vinil sulfônico) (PVS).	36
Figura 14. Espectro característico da HbAg em sua forma oxi no pH 7,0 (linha cheia) e espectro característico da proteína oxidada (linha fina). As setas "A" e "B" representam a diminuição da intensidade de absorção e deslocamento para a	

esquerda da banda de Soret, respectivamente. As setas “C” e “D” mostram o alargamento das bandas Q e o surgimento da banda LMCT, respectivamente. A linha tracejada mostra que a banda de Soret está centrada em 415 nm.	39
Figura 15. Espectros de absorção óptica da HbAg 0,1 mg.mL ⁻¹ , em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL ⁻¹ pH 5.0 (A) e pH 7.0 (D) em função da concentração de CuSO ₄ explorada entre 0-100 μmolL ⁻¹ em período de equilíbrio de 3 horas. Destaque para o deslocamento na região da banda de Soret em pH 5.0 (B) e pH 7.0 (E). (C) e (F) representam o deslocamento da banda de Soret no pH 5.0 e 7.0, respectivamente.	40
Figura 16. Análise por <i>Convex Constraint Algorithm</i> (CCA) do conjunto de espectros mostrados nas figuras 13. (A) e (C) correspondem aos espectros de absorção óptica das espécies puras obtidas por CCA, correspondendo aos valores de pH de 7,0 e 5,0 respectivamente. (B) e (D) correspondem à proporção das espécies em solução conforme o aumento da concentração do metal, para valores de pH de 7,0 e 5,0, respectivamente.	42
Figura 17. (A) e (B) Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg 0,1 mg.mL ⁻¹ , em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL ⁻¹ em pH 5,0 e pH 7,0, respectivamente, em função da concentração de CuSO ₄ explorada entre 0-100 μmolL ⁻¹	43
Figura 18. Espectros de fluorescência da HbAg, 0,1 mg.mL ⁻¹ , com adição crescente de concentrações de CuSO ₄ (0-100 μmol ⁻¹) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L ⁻¹ pH 9,0.	45
Figura 19. Espectros de CD da HbAg 0,1 mg.mL ⁻¹ , em tampão fosfato 20 mmolL ⁻¹ no pH 5,0 (A) e pH 7.0 (B), em função da concentração de CuSO ₄ na faixa de 0-100 μmolL ⁻¹	46
Figura 20. Análise por <i>Convex Constraint Algorithm</i> (CCA) do conjunto de espectros mostrados na figura 17. (A) e (B) correspondem aos espectros de dicroísmo circular das espécies puras obtidas por CCA, correspondendo aos valores de pH de 5,0 e 7,0 respectivamente. (C) mostra as frações das componentes obtidas pelo CCA para a HbAg no pH 7,0 da Figura 17B. (D) representa os valores de elipticidades em 208 e 220 nm da HbAg em 7,0.	46
Figura 21. Espectros de absorção óptica da HbAg na presença de diferentes concentrações de CdCl ₂ em pH 7,0 (A) e pH 5,0 (D). Nos incertos (B) e (E) destaca-se as bandas Q. Em (C) e (F) são mostrados os deslocamentos dos máximos da banda de Soret para pH 7,0 e 5,0, respectivamente.	48
Figura 22. (A) Espectros UV-Vis dos filmes PEI/HbAg após a deposição de vinte e uma camadas em pH 7,0 no substrato de quartzo. (B) Monitoramento da intensidade de absorção em 415 nm de cada um dos filmes crescidos de PEI/HbAg com ajuste para verificar sua linearidade.	51
Figura 23. (A) Espectros de absorção óptica do filme crescido com PEI/HbAg em contato com concentrações crescentes de sulfato de cobre exploradas entre 0 e 70 μmol.L ⁻¹ do metal. (B) Monitoramento do deslocamento da intensidade de absorção óptica da banda de Soret e da absorção máxima em 415 nm.	52
Figura 24. (A) Voltametria cíclica dos filmes crescidos com camadas de PEI/HbAg com a variação dos potenciais de -0,6 a 0,6 volts em tampão fosfato 20 mmolL ⁻¹ , pH	

7,0. (B) Ampliação da área do crescimento dos filmes. (C) Área normalizada dos voltamogramas apresentados em Figura 23A.....	53
Figura 25. Área normalizada $ A - A_0 $ dos voltamogramas decorrentes da interação dos filmes crescidos de PEI/HbAg e PEI/PVS com cobre em 3 diferentes bicamadas: 1, 5 e 10 bicamadas (A, B e C, respectivamente).	54
Figura 26. Área normalizada dos voltamogramas decorrentes da interação dos filmes crescidos de PEI/HbAg com 10 e 20 bicamadas.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina de soro bovino

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

CD – Dicroísmo circular (do inglês “Circular Dichroism”)

CTAC – Cloreto de cetiltrimetilamônio (do inglês “cetyl trimethyl ammonium chloride”)

Dh – Diâmetro hidrodinâmico

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

Hb- Hemoglobina

HbAg – Hemoglobina de *Amyntas gracilis*

HbAm – Hemoglobina de *Arenicola marina*

HbGp – Hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*

HbLt – Hemoglobina de *Lumbricus terrestris*

kDa – kilo Dalton

LBL – Camada por camada (do inglês “Layer-by-layer”)

LMCT – Transferência de carga ligante-metal (do inglês “ligand-metal charge transfer”)

MDa - Mega Dalton

MM – Massa Molecular

PAH – polialilamina hidroclorada

PEI – polietilenoimina

pI – ponto isoelétrico

PVS – polivinil sulfato de sódio

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

SDS – Dodecilsulfato de sódio (do inglês “sodium dodecyl sulfate”)

λ – Comprimento de onda

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

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1 Hemoproteínas	13
1.2 Hemoglobinas extracelulares gigantes	15
1.3 Oxidação e desnaturação de hemoglobinas	18
1.4 Biossensores com proteínas.....	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Geral.....	23
2.2 Específico	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Reagentes	24
3.2 Extração e purificação	24
3.3 Preparo das amostras.....	26
3.4 Técnicas utilizadas.....	27
3.4.1 Espectroscopia de absorção molecular (Uv-Vis)	27
3.4.2 Emissão de fluorescência.....	28
3.4.3 Intensidade de espalhamento de luz	30
3.4.4 Dicroísmo Circular	30
3.4.5 Voltametria Cíclica.....	32
3.4.6 Layer-by-layer (LBL)	35
3.4.7 CCA plus.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Interação da HbAg com cobre pH 5,0 e 7,0	38
4.1.1 Estudos por Absorção ótica	38
4.1.2 Espalhamento de Luz	42
4.1.3 Estudos por Fluorescência	44
4.1.4 Dicroísmo Circular	45
4.2 Interação da HbAg com cádmio	47
4.3 Crescimento dos filmes no substrato.....	50
4.4 Interação com cobre	51
4.5 Crescimento e interação com cobre dos filmes no eletrodo	52
5. CONCLUSÕES	56
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	57
6. REFERÊNCIAS	58

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Hemoproteínas

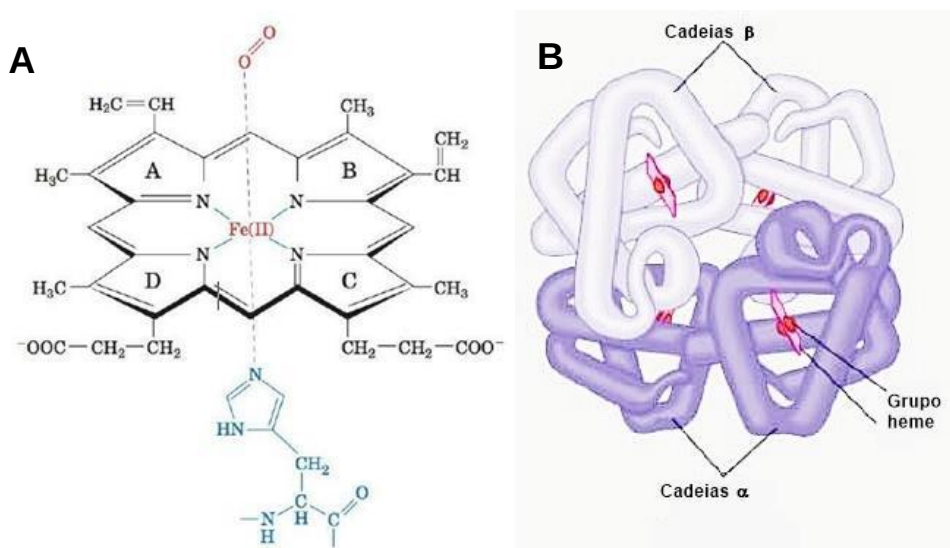
As proteínas são responsáveis por praticamente todos os processos dentro da célula nas mais variadas funções (MARZZOCO e TORRES, 2007). São as mais abundantes e importantes macromoléculas dos organismos, ocorrendo em praticamente todas as células e em todas as partes das mesmas (VOET e VOET, 2013). Podem ser encontradas em diferentes formas dentro dos organismos, desempenhando diversas funções como catálise, composição de tecido muscular, defesa, transporte de moléculas, entre outros (NELSON e COX, 2006).

O metabolismo das células aeróbias depende do recebimento de oxigênio e o CO₂ liberado deve ser removido constantemente. Em alguns organismos essa troca é feita simplesmente por difusão, em outros é necessário a utilização de proteínas especializadas nesta troca de gases. Este é o caso de organismos pluricelulares complexos que necessitam de uma proteína capaz de realizar essa troca, enquadrando perfeitamente para esta função as hemoproteínas (MARZZOCO e TORRES, 2007).

As Hemoproteínas são uma das classes de metaloproteínas responsáveis majoritariamente por carrear oxigênio dos pulmões, brânquias ou da pele de animais para os capilares para ser usado na respiração (VOET e VOET, 2013). Estas biomoléculas apresentam o grupo prostético heme (anel porfirínico que possui em seu centro um átomo de ferro), o qual é responsável pela coloração vermelha das hemoglobinas (Hbs) (VOET e VOET, 2013). Essa coloração pode sofrer mudanças decorrentes das transições eletrônicas do heme devido ao estado de oxidação do ferro que ali se encontra (EATON e HOFRICHTER, 1983; STRYER, 1995).

Dentro das classes das hemoproteínas, temos como destaque a hemoglobina humana (Hb), estudada inicialmente através de cristalografia de Raios-x por Perutz em 1959 (VOET e VOET, 2013). A hemoglobina humana é esférica, apresenta Massa Molecular (MM) de 64 kDa, são formadas por quatro subunidades (duas α e duas β) e a estrutura secundária de cada subunidade é semelhante à da mioglobina. (MARZZOCO, 2007) A Hb é mantida por uma disposição $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$, como mostra a Figura 1.

Figura 1. (A) Representação do sítio de ligação de O₂ no grupo heme. (B) Estrutura da hemoglobina humana com destaque para os grupos hemes em vermelho e as cadeias α e β .



Fonte: Adaptado de Reece, 2010 e Marzzoco e Torres, 2007.

A coordenação do Ferro com o O₂ ocorre do lado oposto da histidina proximal (histidina ligada ao ferro mostrada na Figura 1A). A ligação Fe-O₂ possibilita o transporte de O₂, o que é primordial para a respiração celular e manutenção da vida. Quando a molécula de O₂ não está ocupando a sexta coordenação do ferro, esta ligação pode ser preenchida por uma histidina distal (EATON e HOFRICHTER, 1983; STRYER, 1995). A aproximação da histidina distal pode ser decorrente do processo de dissociação e desnaturação das hemoproteínas (RIFKIND *et al.*, 1994).

A Hb na sua forma nativa possui o átomo de ferro (Fe) no estado ferroso (Fe²⁺) e é denominada de oxi-Hb. Já quando a sexta coordenação do Fe²⁺ não está ligada ao O₂ e sim ligada a algum outro terminal como NO (nitrosila) ou CO (carboxi), teremos a desoxi-Hb. Quando há a oxidação do grupo heme (transição do Fe²⁺ para Fe³⁺), a hemoglobina não é capaz de se ligar ao oxigênio. Neste estado, chamamos a hemoglobina de meta-Hb (NELSON e COX, 2006).

Se houverem outras espécies ocupando a sexta coordenação, a meta-Hb pode receber outros nomes, tal qual aquometa-Hb (quando a sexta coordenação do ferro está sendo ocupada por uma molécula de água) e cianometa-Hb (onde uma molécula de cianeto, CN⁻, se liga ao grupo heme na sexta coordenação do ferro) (EATON e HOFRICHTER, 1983; RIFKIND *et al.*, 1994, AGUSTINHO, *et al.*, 1997).

1.2 Hemoglobinas extracelulares gigantes

Hemoproteínas com múltiplas subunidades são reportadas a diversos invertebrados, como é o caso da hemocianina de camarão (hemoproteína que leva o cobre no seu grupo prostético ao invés do ferro das hemoglobinas). As hemocianinas apresentam MM da ordem de 3,0 – 5,0 MDa, suas subunidades apresentam MM de 250 kDa e possuem atividade fenoxidase (atuando basicamente na defesa do organismo (COATES e NAIRN, 2014). Outra classe de hemoproteínas encontradas são as eritrocruorinas ou hemoglobinas de bicamadas hexagonais e de estruturas mais complexas, os quais são comuns em anelídeos e tem alto peso molecular, em torno de 3000 a 4000 kDa, denominadas assim, hemoglobinas gigantes (BACHEGA, 2013).

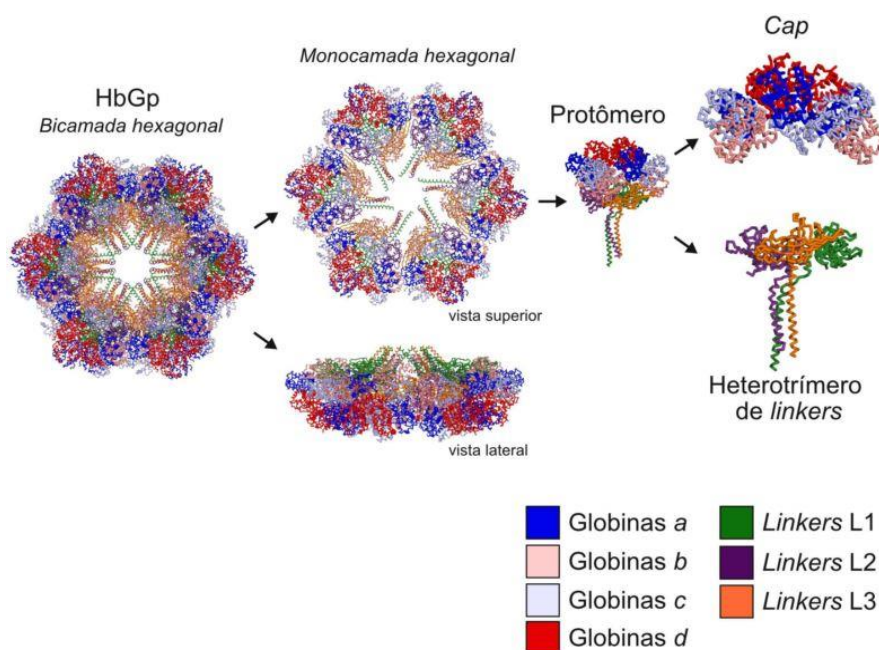
Os anelídeos estão dentre as inúmeras espécies de invertebrados no solo e são muito importantes tanto no que diz respeito à ciclagem da biomassa, quanto na atividade biológica do solo (MERLIM *et al.*, 2005).

O uso, o manejo, a cobertura vegetal e as características físico-químicas e biológicas do solo podem alterar as populações das minhocas (MERLIM *et al.*, 2005). Desta forma, as minhocas são consideradas bons indicadores da qualidade de ecossistemas agrícolas por serem sensíveis a diferentes tipos de manejo e uso do solo (ANDRÉA, 2010). Recentemente, além dos aspectos ecológicos e dos efeitos que causam no solo, as minhocas vêm recebendo especial atenção na área da biotecnologia por possuírem hemoglobinas extracelulares gigantes bastante singulares e interessantes para estudos biotecnológicos. A hemoglobina extracelular de *Arenicola marina* (HbAm) por exemplo, foi estudada por Rousselot e colaboradores (2006) e Harnois e colaboradores (2009) objetivando a obtenção de protótipos de substitutos sanguíneos.

A importância em se estudar as hemoglobinas extracelulares gigantes está relacionada também com sua alta estabilidade oligomérica, resistência à oxidação, alta cooperatividade e alta afinidade para ligar oxigênio (ROUSSELOT *et al.*, 2006; HARNOIS *et al.*, 2009). Outra característica destas hemoproteínas é a presença de várias subunidades com pesos moleculares entre 16 e 32 kDa. Muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo estudam esta classe de hemoproteínas objetivando avaliar seu potencial biotecnológico (KUCHUMOV *et al.*, 1999; CHABASSE *et al.*, 2006; TABAK *et al.*, 2012).

Dados cristalográficos da Hemoglobina extracelular de *Lumbricus terrestris* (HbLt) mostram que a hemoglobina é disposta em uma bicamada hexagonal, e com o resultado do sequenciamento e espectroscopia de massa, verificaram que sua massa molecular é de 3,9 MDa (VINOGRADOV, 1985; ROYER *et al.*, 2006). A hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) também apresenta uma estrutura composta por uma bicamada hexagonal, cada camada contém 6 protômeros e cada protômero $(abcd)_3L_3$ é constituído por 3 tetrâmeros $(abcd)_3$, que podemos chamar de CAP ligadas a 3 linkers, cada globina (*a*, *b*, *c* e *d*) apresenta um grupo heme, totalizando 144 grupos hemes, além de 36 cadeias linkers (BACHEGA 2013). A Massa Molar (MM) estimada da HbGp é da ordem 3,4 MDa através da técnica de Ultracentrifugação analítica AUC (CARVALHO, 2010). A representação da estrutura desta hemoproteína pode ser visualizada na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática no arranjo oligomérico de HbGp, na sua estrutura nativa, obtida a partir de dados cristalográficos. A HbGp é uma bicamada hexagonal com 12 protômeros, sendo 144 cadeias globinas e 36 estruturas denominadas linkers. Ao todo são 144 cadeias de globinas e 36 estruturas tipo linkers.



Fonte: Bachega (2013)

A HbLt e a HbGp são constituídas por 4 subunidades globínicas (*a*, *b*, *c*, *d*) com um grupo heme cada. As cadeias *a*, *b* e *c* estão ligadas através de pontes dissulfeto, formando um trímero *abc*, enquanto que a subunidade monomérica *d* está ligada ao trímero *abc* por meio de atrações eletrostáticas (ROYER *et al.*, 2006; BACHEGA, *et al.*, 2015). Vale mencionar que a HbGp vem sendo amplamente

estudada há quase 30 anos (PERUSSI, *et al.*, 1989) por pesquisadores do Brasil através de diferentes técnicas onde consegue-se observar grande similaridade com a HbLt (SANTIAGO *et al.*, 2007; TABAK, *et al.*, 2012; BACHEGA *et al.*, 2015; CARVALHO, F. *et al.*, 2016; CARVALHO, J. *et al.*, 2016).

A HbLt possui uma grande afinidade por ligação ao oxigênio e alta cooperatividade (HIRSCH *e al.*, 1997). Em estudos de reassociação de proteínas Zhu *et al.* (1996) explicitam que a HbLt é um sistema auto-organizável. São sistemas supramoleculares interessantes, pois, tem capacidade de adaptação em meios ricos com sulfetos (ZAL, *et al.*, 2000).

Estudos mostram que estas proteínas podem ser estocadas por longos períodos, em torno de seis meses a um ano a 4°C, sem que sua capacidade de transporte de oxigênio seja afetada, devido resistência a oxidação da hemoglobina (Hb) à meta-hemoglobina (SANTIAGO *et al.*, 2007).

Vários grupos utilizam-se das muitas características desta classe de hemoglobinas para os diversos estudos de inovação científicos e tecnológicos. Zal e Rousselot (2014) indicam o uso da hemoglobina de *Arenicola marina* (HbAm) como substituto sanguíneo para bovinos e ainda estudos avançados em protótipos de carreadores de oxigênio para transplantes e preservação de órgãos. Os autores ainda ressaltam que a molécula não induz a vasoconstrição, desta forma, a molécula pode ser considerada uma precursora do desenvolvimento de um futuro carreador de oxigênio para portadores de anemia ou isquemia.

Outra aplicação interessante para as hemoglobinas extracelulares gigantes é a possível utilização como biossensor de poluentes ambientais, como é o caso do presente trabalho. Na literatura ainda não foram reportados biossensores utilizando hemoglobinas extracelulares gigantes, este protótipo de biossensor é inédito.

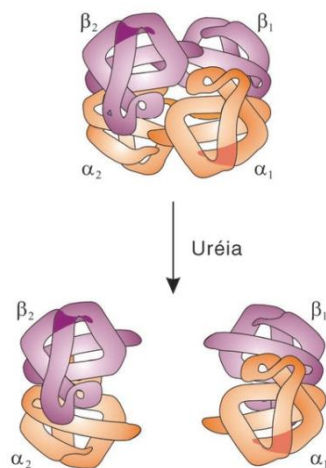
Neste trabalho foi estudada a hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg), o qual é uma hemoglobina homóloga à HbGp. O anelídeo *Amyntas gracilis* é uma espécie exótica no Brasil e de origem asiática, sendo bastante encontrada em regiões frescas e/ou úmidas das regiões sul e sudeste do país. São minhocas encontradas preferencialmente em zonas agrícolas, mas também em florestas nativas.

1.3 Oxidação e desnaturação de hemoglobinas

Quando as proteínas são sintetizadas nas células, sua estrutura primária dobra-se espontaneamente, originando as estruturas secundárias e terciárias, e se possuir uma estrutura quaternária, ela também se rearranja espontaneamente, revelando desta forma a proteína nativa (MARZZOCO e TORRES, 2007). Porém, ao entrar em contato com agentes desnaturantes, ela pode sofrer processos que modificam sua forma nativa e desativam algumas funções.

A interação da hemoglobina com agentes caotrópicos (como ureia, surfactantes e metais pesados) e alta temperatura pode ocasionar sua oxidação, promovendo alterações no centro férrico do grupo heme (CARVALHO *et al.*, 2013; CALISI *et al.*, 2011; POLI *et al.*, 2006). Os agentes caotrópicos aumentam a solubilidade de substâncias apolares em água, desta forma, sua eficácia como agentes desnaturantes é devida à sua capacidade em romper interações hidrofóbicas (VOET e VOET, 2013). Em estudos com a HbGp em condições que provocam a oxidação, Agostinho e colaboradores (1997) demonstraram que a espécie oxidada sofre uma dissociação completa em trímeros e monômeros. Propondo que a hemoglobina na forma oxidada é mais instável (quando comparamos o arranjo oligomérico) que a espécie na forma oxi, evidenciando que a oxidação da proteína favorece a sua dissociação protéica. Para exemplificar o processo de dissociação, verificamos o processo de dissociação da Hb humana em meio à ureia na Figura 3.

Figura 3. Estrutura quaternária da hemoglobina humana. Dissociação da hemoglobina quando posta em solução concentrada de uréia, o tetrâmero se dissocia em dímeros $\alpha\beta$.

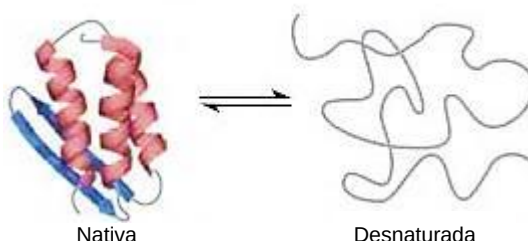


Fonte: Adaptado de Marzzoco e Torres (2007)

A associação e a dissociação das subunidades da estrutura da HbLt dependem do estado de oxidação do ferro do grupo heme (ZHU *et al.*, 1996). Em seu trabalho de interação da HbGp com surfactantes, Santiago *et al.* (2007) verificou que a hemoglobina sofre oxidação na presença destes agentes e posterior dissociação. O mesmo processo foi observado para a HbAg na presença dos surfactantes SDS e CTAC (RAMOS, 2017).

Quando a proteína perde sua estrutura (e consequentemente sua atividade) ela está desenovelada (do inglês “unfolding”), como mostra a Figura 4. Solventes orgânicos que alterem a constante dielétrica do meio, altas temperaturas, drásticas mudanças de potencial hidrogeniônico (pH) e também a presença de desnaturantes químicos como agentes caotrópicos, podem causar a desnaturação da proteína (HARDING e CHOWDHRY, 2000; CHAIRES, 2008).

Figura 4. Representação da estrutura de uma proteína em sua forma nativa e após a desnaturação.



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2006)

Estudos de dissociação, oxidação e desnaturação da HbGp foram realizados na presença de ureia e surfactantes (Poli *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2013). Nestes estudos os autores observaram que a HbGp na presença de 2 mmol.L⁻¹ de SDS no pH 7 houve a dissociação da hemoproteína em dois discos hexagonais além da parcial dissociação monomérica, porém 0,75 mmol.L⁻¹ de SDS já induz uma dissociação da proteína, e, que na presença de 4 mol.L⁻¹ de uréia a HbGp apresenta drásticas mudanças em suas estruturas secundárias.

O efeito de diferentes metais pesado (cádmio, cobre e mercúrio) na oxidação da hemoglobina de *Lumbricus terrestres* (HbLt) foi estudado por Calisi *et al.* (2011) utilizando minhocas vivas. Nestes estudos os autores observaram a ocorrência de met-Hb no sangue de minhocas na presença dos três diferentes metais. As minhocas foram colocadas em contato com estes metais e houve a formação de met-Hb, além do aumento de peso das hemoglobinas com o passar do tempo de

exposição. Estes estudos sugerem que os anelídeos são bons bioindicadores de contaminação ambiental.

Estudos realizados com hemoglobina purificada de anelídeos expostas a sulfetos mostraram que o espectro de absorção da banda de Soret da hemoproteína desloca do comprimento de onda (λ) característico (415 nm) para menores λ (405 nm) (BAILLY e VINOGRADOV, 2005) evidenciando o processo de oxidação da mesma. Estas alterações também podem ser observadas em hemoglobinas de anelídeos que vivem em solos contaminados com pesticidas, resíduos tóxicos, lamas residuais e metais. Sugerindo que hemoglobinas de determinados anelídeos podem ser bons indicadores de contaminação de solo (STEFFEN *et al.*, 2013; DEDEKE *et al.*, 2016) e, desta forma, o uso de sua hemoglobina pode ser estudado para o biossensoriamento desses metais.

Tamás *et al.* (2014) mostra que metais pesados afetam profundamente a homeostase proteica e a viabilidade celular, causando agregação e desenovelamento de proteínas, mais um fator que pode indicar a oxidação e desnaturação destas biomoléculas.

Estudos como estes podem despertar o interesse para a utilização das hemoglobinas extracelulares como biossensor. Vale salientar que a hemoglobina extracelular de anelídeo apresenta uma maior estabilidade oligomérica e oxidativa quando comparada com a hemoglobina humana (ARTMANN *et al.*, 2004; FREIRE, 1995). Diante das características das hemoglobinas extracelulares gigantes expostas, a vida útil do biossensor fabricado com estas hemoproteínas poderá ser maior que um desenvolvido com as hemoglobinas humanas.

1.4 Biossensores com proteínas

Os sensores estão sendo cada vez mais utilizados no nosso dia a dia, tanto para melhorar a qualidade de vida das pessoas quanto para auxiliar em diagnósticos de doenças, e consequentemente melhorar nossa saúde (SILVA *et al.*, 2016; VELLO *et al.*, 2017). Atualmente existem vários tipos de sensores e biossensores (sensores que utilizam alguma molécula biológica em sua composição) que são utilizados em diversas áreas do conhecimento.

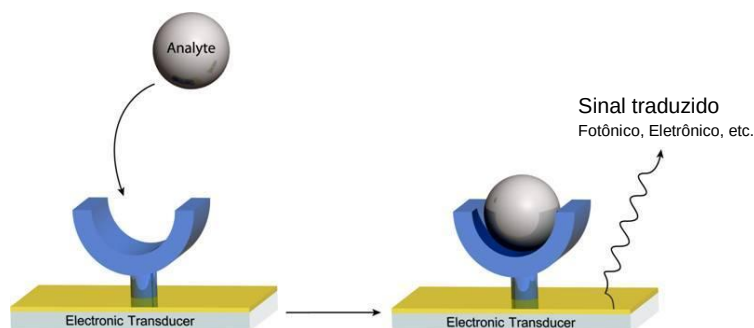
Dentre os diversos tipos de sensores, os biossensores por afinidade e biossensores catalíticos são amplamente estudados. Os de afinidade usam ligantes seletivos e fortes, como por exemplo o sistema antígeno-anticorpo, receptores de

membranas ou oligonucleotídeos com o analito alvo para produzir um sinal elétrico mensurável. Já os sensores biocatalíticos utilizam enzimas e/ou materiais biológicos (como pedaços de tecidos biológicos e células inteiras) como elemento de reconhecimento molecular. Devido à alta especificidade das enzimas e grande velocidade nas reações, elas são amplamente empregadas (RONKAINEN, *et al.*, 2010). Outros sensores utilizados são os biossensores de detecção eletroquímica.

Os biossensores com detecção eletroquímica desempenham um papel muito importante para clínicas, meio ambiente, indústrias farmacêuticas e diversos outros canais da saúde devido à sua sensibilidade e seletividade (RONKAINEN *et al.*, 2010), e podem ser voltamétricos, potenciométricos e condutimétricos.

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 *et al.*, 2010). Na Figura 5 está apresentado um exemplo de um biossensor de reconhecimento molecular.

Figura 5. Modelo de um biossensor de reconhecimento molecular, o analito é específico ao sistema de reconhecimento. Após a ligação, o transdutor eletrônico emite um sinal para um detector.



Fonte: Adaptado de Weizmann (2018).

Um biossensor para a detecção do pesticida metamidofós foi elaborado por Ramos *et al.* (2012). Este sensor utiliza a enzima acetilcolinesterase imobilizada num substrato de vidro para a detecção do metamidofós, que é um pesticida muito utilizado em culturas de amendoim, tabaco, pimenta e trigo. Verificando a atividade da enzima, o grupo observou que existe uma variação do pH (produção de prótons H^+) a medida que a enzima entra em contato com o pesticida. Desta forma, pode-se mensurar essa variação e criar um biossensor.

Muitos são os trabalhos imobilizando proteínas e peptídeos em substratos sólidos com o objetivo de fabricar biossensores, tanto para contaminação ambiental,

quanto para a área da saúde. Figueiredo *et al.* (2013) desenvolveram um método de detecção de um biomarcador excretado pelo vírus da dengue a partir da proteína da gema do ovo para verificar se o indivíduo está contaminado com a doença. Cerrutti e colaboradores (2015) mostraram a possibilidade de imobilização de um peptídeo análogo a um peptídeo de reconhecimento molecular do vírus HIV, usando lignina como matriz imobilizante para fabricar imunossensores. Anh e colaboradores (2004) apresentaram um biossensor usando a enzima tirosinase para detecção dos herbicidas Diuron, Atrazina e seus produtos de degradação Desetilatrazina (DEA) e Desisopropilatrazina (DIA).

Uma técnica bastante utilizada para fabricar estes biossensores é a técnica de *Layer-by-Layer* (LBL), 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. Um dos trabalhos pioneiros sobre esse tipo de montagem de filme com controle da espessura e arquitetura molecular de Lvov *et al.* (1995), ressalta a vantagem da técnica em preservar a atividade da proteína nas condições de fabricação dos filmes.

Outras técnicas de avaliação de metais pesados em efluentes e solos contaminados requerem um custo maior, pois as amostras podem ser analisadas com técnicas como absorção atômica, fotometria de chama, espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado, entre outras técnicas, por exemplo. (FERREIRA, 2003).

Desta forma, fazer a avaliação das características biofísicas da HbAg pode trazer informações relevantes tanto para a biologia das espécies, como para suas aplicações biotecnológicas, tendo em vista que as hemoglobinas gigantes extracelulares apresentam custos reduzidos e são fáceis de serem estocadas (MOREIRA *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a potencialidade da HbAg como biossensor de contaminação ambiental, iniciando estes estudos com a interação da HbAg com metais pesados monitorada por espectroscopia de absorção ótica e a imobilização da HbAg em filmes automontados, via técnica de deposição camada por camada, LBL.

2.2 Específico

1. Avaliar a interação da HbAg com os metais pesados cobre e cádmio por absorção ótica e espalhamento de luz.
2. Imobilizar a hemoglobina HbAg, através da técnica de LBL em junção dos polieletrólitos polietileno imina (PEI) e polialilamida hidrociorada (PAH) analisando as interações polímero-proteína. Para tal foram utilizadas medidas espectroscópicas de absorção ótica.
3. Estudos preliminares de detecção de metais e pesticidas através de biossensores montados com a HbAg monitorado por voltametria cíclica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

As soluções de cobre foram preparadas a partir de Sulfato de cobre II pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), obtido da empresa Sigma Aldrich, com pureza de 99%. Já as soluções de cádmio foram preparadas a partir de cloreto de cádmio anidro, pureza de 99%, também obtido da empresa Sigma Aldrich. Ambas as soluções foram preparadas com água Milli-Q (condutividade máxima 18,3 μS). Os sais utilizados para o preparo dos tampões, acetato de sódio, fosfato de sódio e borato de sódio foram obtidos da Sigma Aldrich.

Os polieletrólitos utilizados para deposição da HbAg nos substratos de quartzo e nos eletrodos automontados foram PEI e o PAH, ambos obtido da empresa Sigma-Aldrich.

3.2 Extração e purificação

A hemoglobina extracelular em estudo é extraída a partir da hemolinfa do anelídeo *Amyntas gracilis* pertencente à classe Oligochaeta, família Megascolecidae e do gênero *Amyntas* (Kinberg, 1866). As características físicas de cada espécime limitam-se a um comprimento que varia de 80 a 120 mm, diâmetro de 4 a 7 mm e massa de 4 a 6 g. A obtenção dos espécimes foi feita por meio da empresa Minhobox, situada em Juiz de Fora/MG. A extração da hemolinfa foi realizada no laboratório de Biomoléculas, UNESP, Registro. Para cada extração da hemolinfa foi utilizado 120 animais, cada animal foi anestesiado com água gelada por um período de 10 a 15 min. Foi feita uma incisão na parte superior do animal, numa região próxima a cabeça para evitar as enzimas digestivas, em seguida a hemolinfa foi coletada com uma pipeta Pasteur até o esgotamento do animal, adicionando citrato de sódio 0,1 mmolL^{-1} na hemolinfa para evitar a coagulação como mostra a Figura 6.

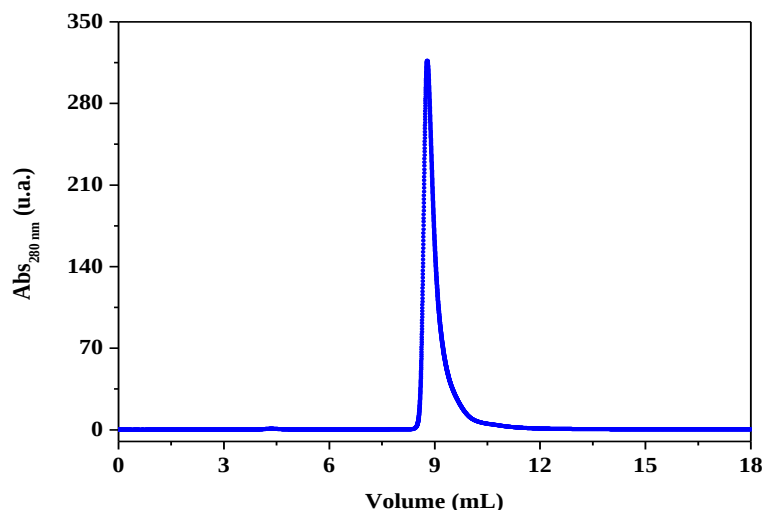
Figura 6. Foto do anelídeo *Amyntas gracilis* no momento da extração da hemolinfa.



Fonte: Autor

Em seguida, a hemolinfa foi centrifugada a 5.000 rpm ($3.164 \times g$) por 15 min a 4°C para eliminar restos de células e resíduos, seguido por 12 horas de diálise em uma membrana de corte de 30 kDa com tampão tris-HCl 100 mmolL^{-1} , pH 7,0. Depois de dialisada a hemolinfa foi ultracentrifugada a 60.000 rpm ($250.000 \times g$) por 5 horas a 4°C para sedimentar a HbAg. A proteína foi obtida na forma de “pellet”, sedimentada no fundo do tubo, sendo ressuspensa em um volume de 3 – 4 mL de tampão tris-HCl 100 mmolL^{-1} , pH 7,0, e armazenada a 4°C na geladeira. Posteriormente alíquotas de 1,0 mL de hemolinfa foram purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho, em uma coluna de Sephadex G-200 equilibrada em tampão tris-HCl 100 mmolL^{-1} , pH 7,0. Este procedimento foi realizado até que toda a hemoglobina ressuspensa fosse purificada. Ao final da purificação são obtidos cerca de 4 mL de HbAg com concentração de 30 mg.mL^{-1} . Na Figura 7 é apresentado o cromatograma da HbAg na sua forma íntegra após o processo de purificação, evidenciando a completa purificação da HbAg.

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



Fonte: Autor

Todas as concentrações foram determinadas espectroscopicamente utilizando o valor de absortividade molar $\epsilon_{415 \text{ nm}} = 5,1 \pm 0,6 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A HbAg foi armazenada a 4°C para os posteriores ensaios de caracterização.

3.3 Preparo das amostras

Para os ensaios de absorção ótica, fluorescência e espalhamento de luz, as amostras de HbAg foram preparadas na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL⁻¹, tanto para as titulações com cobre quanto para as titulações com cádmio. Para as análises com cobre foram adicionadas concentrações crescentes de CuSO₄ (entre 1 μmolL⁻¹ a 100 μmolL⁻¹), totalizando 14 amostras, incluindo a amostra com ausência de cobre (0 μmolL⁻¹) para controle. De modo semelhante, para as análises com cádmio foram adicionadas concentrações crescentes de CdCl₂ (entre 1 μmolL⁻¹ a 100 μmolL⁻¹), totalizando 14 amostras, incluindo a amostra com ausência de cádmio (0 μmolL⁻¹) para controle. Vale ressaltar que a concentração final da hemoglobina foi mantida em 0,1 mg.mL⁻¹. Em todas as medidas as amostras permaneceram em repouso após o seu preparo por 3 horas a 25 °C e em seguida foram centrifugadas a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos, recolhendo somente o sobrenadante para as análises espectroscópicas. As análises

foram realizadas nos valores de pH de 7,0 e 5,0. Inicialmente, as análises foram realizadas após 3, 6 e 24 horas após o preparo das amostras. Porém, após as análises prévias foi verificado que após 3 horas de equilíbrio os espectros de absorção não apresentaram mudanças significativas. Por isso, todos os espectros apresentados nesta qualificação foram coletados após 3 horas de equilíbrio. Os experimentos foram realizados a 25°C. Todas estas análises foram realizadas no espectrofotômetro Shimadzy UV1800 e espectrofluorímetro RF6000 no laboratório de Biomoléculas, UNESP, Registro.

As medidas de Dicroísmo Circular foram realizadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas e também no Instituto de Química de São Carlos da USP na cidade de São Carlos. Foram preparadas amostras com concentração de HbAg de 0,1 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato 20mmolL⁻¹, nos valores de pH de 5,0 e 7,0. A partir daí, foram adicionados os metais cádmio e cobre nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente e com o mesmo tempo de equilíbrio, sem alterar a concentração final de proteína.

3.4 Técnicas utilizadas

3.4.1 Espectroscopia de absorção molecular (Uv-Vis)

As medidas de absorção ótica foram realizadas com varredura de 700 – 250 nm, 25 °C e cubetas com caminho óptico de 1,0 cm.

A absorção ótica é uma técnica que utiliza a relação entre a radiação incidente e a radiação transmitida de amostras que geralmente encontram-se diluídas. Essa técnica é baseada na Lei de Lambert-Beer, na qual utiliza-se de uma relação entre a luz absorvida, concentração da amostra e o caminho ótico percorrido pela luz na amostra. 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 expressados na forma de absorbância (Abs) pela seguinte equação:

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

Onde 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 (EATON e HOFRICHTER, 1983; SKOOG, 2002). Desta forma, os elétrons absorvem uma quantidade de energia da radiação aplicada e deslocam-se para níveis de energia mais altos.

Esta técnica nos permite estudar uma grande variedade de biomoléculas, entre as quais, grupos heme das hemoglobinas, que absorvem energia na região do UV-Vis. Os comprimentos de onda dos máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) são um dos parâmetros mais importantes a serem estudados por nós através desta técnica.

Nas hemoglobinas, utilizamos os comprimentos de onda entre 700 – 250 nm para monitorar as mudanças de interesse, pois, nesta região existem bandas características do grupo heme (anel porfirínico) das hemoglobinas, como a banda de Soret que é centrada em 415 nm e as bandas denominadas Q, que se encontram 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 (EATON e HOFRICHTER, 1983; POLI *et al.*, 2006, SANTIAGO *et al.*, 2008).

3.4.2 Emissão de fluorescência

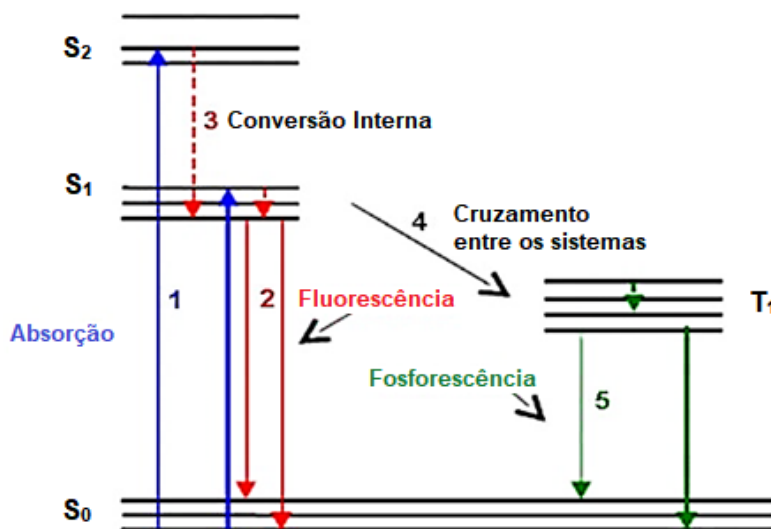
A espectroscopia de fluorescência é utilizada no estudo das biomoléculas para obter-se algumas informações acerca das modificações na estrutura tridimensional de uma proteína, dentre elas o processo de desnaturação, dissociação, interação com pequenas moléculas e supressão.

A fluorescência é um processo de fotoluminescência onde as moléculas são excitadas por absorção de radiação eletromagnética. Após isso, as espécies excitadas relaxam ao estado fundamental, liberando energia excedente através de fótons. Uma das características mais importantes desta técnica está na sensibilidade intrínseca, onde pode ser de uma a três vezes maior que a da espectroscopia de absorção (SKOOG, 2002).

A molécula no estado excitado possui um tempo de vida relativamente longo de 10^{-9} segundos, sendo que parte da energia absorvida é perdida para o meio, ou a fluorescência é suprimida por fenômenos como movimentos vibracionais, rotacionais, etc. (SKOOG, 2002).

A luminescência molecular é dividida em fluorescência e fosforescência dependendo da natureza do estado excitado. Se esse estado for singleto, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, tem-se a fluorescência, conforme o diagrama de Jablonski na Figura 8 (SKOOG, 2002).

Figura 8. Diagrama de Jablonski. (1) Absorção de radiação ($S_0 \rightarrow S_1$), (2) Emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$), (3) Conversão interna e relaxação vibracional ($S_1 \rightarrow S_0$), (4) Cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$), (5) Emissão de fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0$).



Fonte: Adaptado de Lakowitz (1983).

Ainda que muitas moléculas interatuem com a radiação eletromagnética, absorvendo fótons de luz, um pequeno número de moléculas apresenta fluorescência. Quando a diferença de energia entre S_1 (primeiro estado Singleto excitado) e S_0 (estado fundamental) não for grande e haver possibilidade de sobreposição de níveis vibracionais, a molécula por ser conduzida ao estado fundamental, S_0 , por relaxamento vibracional sem emissão de radiação eletromagnética. Porém, quando a diferença energética entre os dois estados (S_1 e S_0) for moderadamente grande, a desativação para o estado fundamental ocorrerá com emissão de radiação na forma de fluorescência (SKOOG, 2002; LAKOWITZ, 1983).

A fluorescência é uma importante técnica para observar processos de dissociação e desnaturação de proteínas. Comumente, a fluorescência das proteínas é do tipo intrínseca, desta forma, associada aos aminoácidos aromáticos que compõe parte da proteína. Estes aminoácidos em geral, são a fenilalanina, triptofano e tirosina. Para o estudo realizado, o aminoácido monitorado foi o triptofano, devido a sua sensibilidade ao ambiente que ele está exposto, apresentando características fluorescentes, as quais dependem do grau de exposição ao solvente hidrofílico ou regiões hidrofóbicas da proteína (LAKOWITZ,

1983). Neste estudo as amostras foram excitadas em 295 nm e com varredura na emissão de 305 á 450 nm.

Vale salientar que, quando o triptofano que está no bolsão do heme é exposto ao solvente, há um aumento da emissão de fluorescência, que por sua vez, pode indicar a dissociação e/ou desnaturação da proteína.

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

3.4.3 Intensidade de espalhamento de luz

O espalhamento de luz ocorre quando o campo elétrico oscilante da radiação incidente numa molécula induz oscilações periódicas na sua nuvem eletrônica, passando o mesmo a funcionar como fonte secundária de radiação. O campo elétrico da luz incidente acelera as partículas carregadas, fazendo com que estas emitam radiação com a mesma frequência de onda incidente, e então ocorre o espalhamento de luz.

Vale mencionar que neste espalhamento de luz não há perda de energia, as moléculas se movimentam na direção perpendicular a sua aceleração, e a radiação emitida será polarizada na direção observada. Assim, as medidas de LSI (Intensidade de espalhamento de luz) foram monitoradas no espectrofluorímetro usando o λ de excitação e o λ de emissão em 350 nm (VAN HOLD, 2006).

Com base no exposto e considerando que a intensidade de espalhamento de luz é diretamente proporcional ao volume da partícula ao quadrado, através do LSI podemos verificar a interação da hemoglobina com alguns ligantes e avaliar a dissociação ou agregação da proteína na presença de agentes caotrópicos (POLI *et al.*, 2006; SANTIAGO *et al.*, 2007).

As medidas de espalhamento de luz foram realizadas em um espectrofluorímetro RF- 6000 SHIMADZU, usando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm, com fendas de excitação e emissão de 3,0 e 5,0 nm (90°), respectivamente, comprimento de onda de excitação e emissão foram em 350 nm e todas as medidas foram realizadas a 25°C.

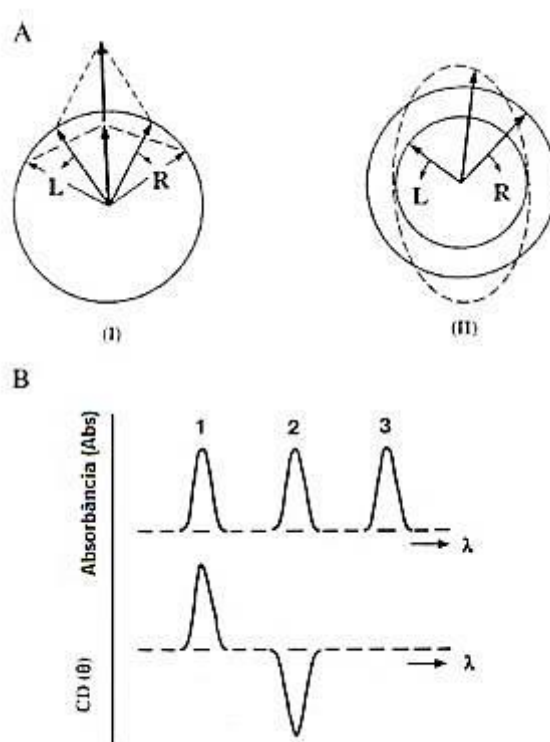
3.4.4 Dicroísmo Circular

A técnica de Dicroísmo Circular (CD) é um importante instrumento para o

estudo das estruturas secundárias de proteínas em solução. Esta técnica baseia-se na diferença da absorção da luz circularmente polarizada entre o sentido horário e o sentido anti-horário (direita ou à esquerda, respectivamente) da cadeia polipeptídica, para proteínas (FASMAN, 1996). Essas mudanças conformacionais podem ser ocasionadas por ligantes, agentes desnaturantes e temperatura (VAN HOLD *et al.*, 2006).

O CD pode ser definido como a razão entre o semieixo menor e semieixo maior da elipse desenhada pela polarização (tangente do ângulo de elipsidade θ). A Figura 9 esquematiza o processo descrito.

Figura 9. (A) Componente a direita (R) e a esquerda (L) de uma radiação circularmente polarizada: (I) as duas componentes possuem a mesma amplitude; (II) as duas componentes possuem amplitudes diferentes que resultam em uma polarização elíptica. (B) relação dentre a absorbância e espectro de CD. Na banda 1 ocorre maior absorção L que R, em 2 maior absorção em R que L, em 3 a absorção em R e L são iguais.



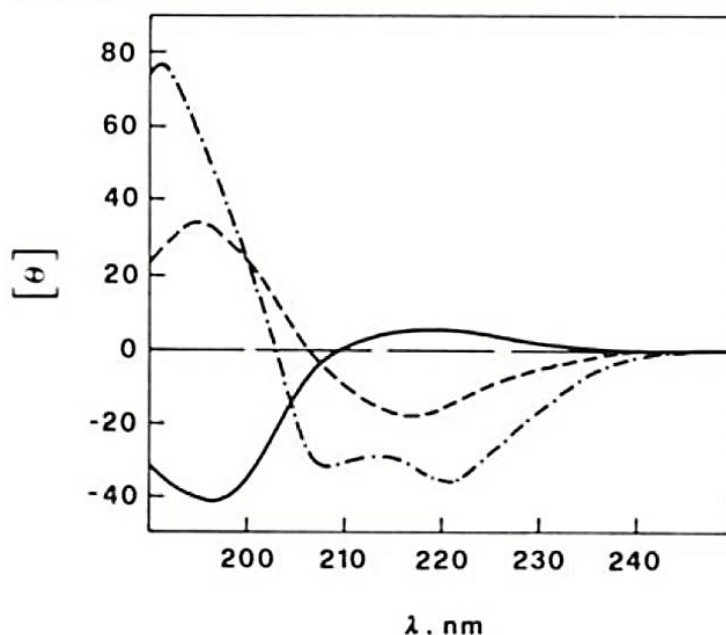
Fonte: Adaptado de Fasman (1996)

A ocorrência natural da maioria dos aminoácidos dos sistemas biológicos é de forma quiral, desta forma a estrutura secundária formada por estas moléculas apresentam características quirais. A região de absorção UV do cromóforo

peptídico se encontra entre 180-240 nm, e possui elétrons não ligantes nos átomos de O e N e os elétrons π encontram-se nos orbitais dos átomos de O, N e C (KELLY *et al.*, 1997; VAN HOLD *et al.*, 2006).

As formas estruturais peptídicas encontradas em proteínas podem ser de três tipos: folhas- β , α -hélices e estruturas aleatórias (NELSON E COX, 2006). Os espectros de CD de proteínas são caracterizados por ombros de elipticidade e de intensidade similar em 222 nm (transições $\pi \rightarrow \pi^*$) e em 208 (parte das transições $\pi \rightarrow \pi^*$) que caracterizam as α -hélices, em 215 nm temos um ombro referente as folhas- β além de um ombro positivo em 198 nm que é associado à região dos aminoácidos (FASMAN, 1996). Na Figura 10 podemos observar os espectros característicos de CD de proteínas.

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



Fonte: Kelly e Price (1997).

As análises de CD foram realizadas à temperatura ambiente (20 °C) e os espectros apresentados representam uma média de quatro acumulações. Estas amostras foram preparadas em tampão fosfato 20 mmolL⁻¹.

3.4.5 Voltametria Cíclica

As técnicas voltamétricas, inicialmente reportadas por Jaroslav Heyrovsky foram estudadas por meio de sistemas envolvendo mercúrio, aplicados ao estudo de

processos com íons metálicos em soluções (PACHECO *et al.*, 2013). Das primeiras configurações até os dias atuais, os sistemas eletroquímicos recebem diversas contribuições não só do ramo da química, mas de áreas como eletrônica, engenharia de materiais e diversas outras. Estas contribuições tornaram a técnica mais viável e com um custo bem mais reduzido, além da miniaturização de alguns equipamentos que proporcionam a mobilidade e fácil manuseio do potenciostato. Desta forma, as técnicas voltamétricas se apresentam como uma boa alternativa para muitas aplicações na química analítica (PACHECO, 2013).

Os métodos eletroanalítico se utilizam de algumas propriedades elétricas mensuráveis como corrente elétrica, diferenças de potencial, acúmulo de cargas, entre outros, a partir de fenômenos nos quais uma espécie redox pode interagir física e/ou quimicamente com os demais componentes do meio. Essas medidas (que são chamadas sinais eletroquímicos) estão relacionadas com alguns parâmetros químicos característicos de cada espécie (WANG, 2000).

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos ocorrentes na interface entre o eletrodo de trabalho e a camada fina da solução que está sob o eletrodo. É uma técnica dinâmica, pois a cela é operada na presença de corrente elétrica que é medida em função da aplicação de um potencial (SKOOG, 2002). Desta forma, as informações sobre o analito são obtidas através da magnitude da corrente elétrica que surge entre os eletrodos de trabalho e de referência (PACHECO, 2013).

Na voltametria o parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i), então, $i = f(E)$. Voltamograma é o registro da corrente em função do potencial e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante o processo de oxirredução, pode ser relacionada com a quantidade de analito na interface do eletrodo. O analito deve ser capaz de sofrer a reação redox na amplitude do potencial estudado.

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica que foi utilizada está apresentada na Figura 11. Durante a varredura do potencial, o potenciostato registra a corrente que é gerada como função do potencial aplicado, utilizando-se da oxirredução e um gerando um voltamograma.

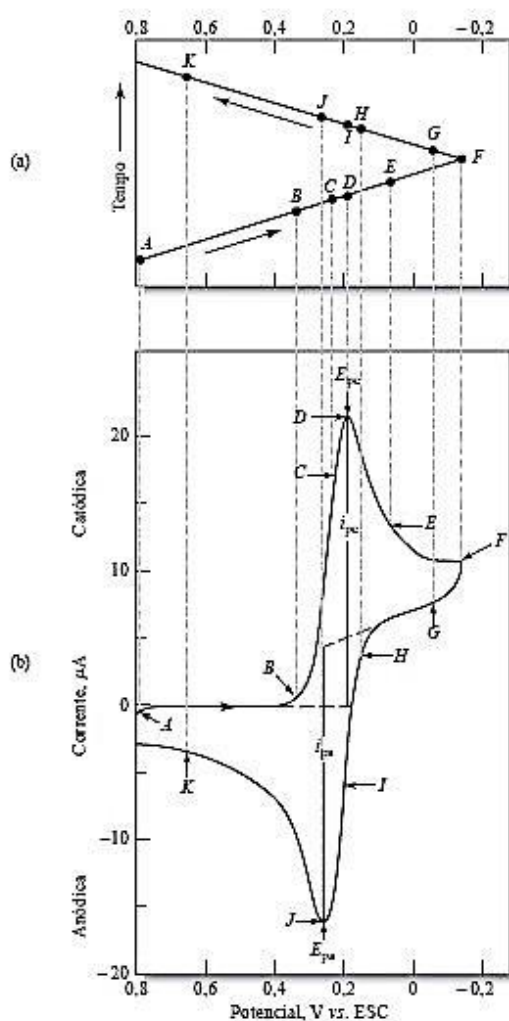
A direção da varredura inicial pode ser negativa ou positiva, dependendo da composição da amostra. Quando a varredura é na direção de potenciais mais negativos é chamada varredura direta e para potenciais positivos é varredura

inversa. Para um experimento, os potenciais de inversão são escolhidos de maneira que a oxidação e a redução do analito possam ser analisadas.

O potenciostato utilizado neste trabalho foi o da marca Dropsens μ STAT 200 no laboratório do ICT, da UNIFESP, Campus São José dos Campos.

O eletrodo utilizado neste trabalho de mestrado foi o modelo DRP- 110 da empresa Drop Sens, com dimensões de 3.4 x 1.0 x 0.05 cm (comprimento x largura x espessura) e o eletrodo de trabalho de carbono com diâmetro de 4 mm, além de um eletrodo de referência. 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. As soluções com cobre foram expostas ao sensor por 2 minutos cada uma, onde após cada exposição, foi efetuada uma leitura do voltamograma.

Figura 11. (a) Curva potencial vs. tempo e (b) voltamograma cíclico para uma solução de $K_3Fe(CN)_6$ 6 mmol.L⁻¹ e KNO_3 1 mol.L⁻¹.



Fonte: Adaptado de Skoog, 2002; Kissinger, 1983.

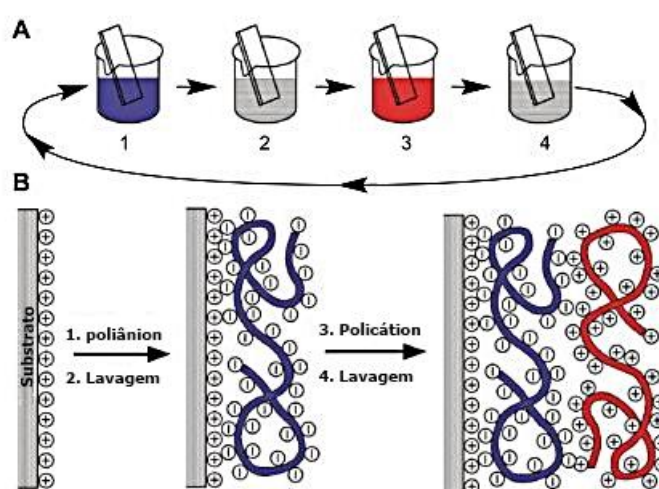
3.4.6 Layer-by-layer (LBL)

A técnica de layer-by-layer que foi bastante difundida por Decher por meio de vários trabalhos realizados na década de 1990. É uma técnica alternativa à de Langmuir-Blodgett (LB) de fabricação de filmes nanoestruturados (ROZ *et al.*, 2015).

A técnica Layer-by-layer (ou no português camada por camada) é uma técnica muito conhecida para obtenção de filmes nanoestruturados que permite depositar, com certo controle, camadas sobrepostas de diferentes materiais como polímeros, enzimas, células ou nanopartículas. Há aplicações nas áreas eletrônicas, sensores e em grande parte da biotecnologia (Decher, 1997). A técnica é famosa por sua simplicidade e baixo custo para a obtenção dos filmes.

A princípio, o substrato (que pode ser uma placa de quartzo, vidro ou sensores automontados) é imerso em uma solução com espécies carregadas (positiva ou negativamente), nesta etapa o polieletrólito é adsorvido na superfície do substrato por atração eletrostática. Em seguida o substrato é imerso numa solução de enxágue e, a seguir, numa solução com cargas opostas. Desta forma a atração das cargas faz com que uma bicamada cresça, e, após várias repetições, temos um número maior de bicamadas. A Figura 12 apresenta um esquema genérico da deposição e formação de um filme de LBL.

Figura 12. (A) Representação esquemática da deposição dos polieletrólitos no substrato. Passos 1 e 2 mostram a adsorção do poliânion e 3 e 4 do policátion. (B) Ilustração molecular básica da adsorção dos polieletrólitos.



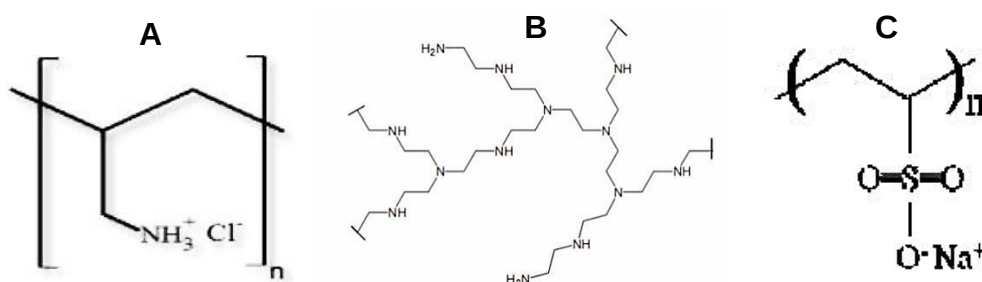
Fonte: Adaptado de Decher (1997)

Os polieletrólitos de suporte utilizados no o presente trabalho foram a PEI e o PAH. Estes foram utilizados em dois valores de pH distintos: 5,0 e 7,0, para servir de

suporte para a imobilização da HbAg. O poli(vinilsulfato de sódio) (PVS) foi utilizado para simular a HbAg e servir como um branco para o ensaio. Como o PVS não se oxida na presença de cobre, podemos comparar o filme PVS/PEI com o filme HbAg/PEI e verificar a oxidação no sensor. O substrato sólido utilizado foi o quartzo. Este substrato foi previamente lavado em solução alcoólica de KOH 3% (Etanol + KOH) num banho de ultrassom por 2 horas a 25°C. Em seguida, foi abundantemente lavado com água Milli-Q. Após esta etapa, para a adsorção do polieletrólito catiônico (PEI), o substrato foi imerso na solução de PEI 1,0 mg.mL⁻¹ por 30 minutos, fazendo com que uma camada do polímero se adsorvesse na superfície do substrato.

Depois da adsorção da primeira camada, o substrato foi imerso em água Milli-Q para retirar o excesso de moléculas não adsorvidas, e então imergiu o substrato numa solução de HbAg com concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ por 10 minutos. Após esta etapa, imergiu-se o substrato numa solução com tampão fosfato 20 mmolL⁻¹ pH 7,0. Depois da primeira adsorção do polímero, o tempo de imersão dele no substrato passou a ser de 10 minutos. A cada passo, o auxílio do gás nitrogênio foi fundamental para a secagem do filme. O mesmo procedimento foi utilizado para os filmes crescidos com o polieletrólito PAH e PVS. O crescimento das multicamadas PEI/HbAg, PAH/HbAg e PVS/HbAg foi monitorado por espectrofotômetro UV-vis para cada bicamada. As fórmulas estruturais dos polímeros estão mostradas na Figura 13.

Figura 13. Fórmulas estruturais de (A) hidrocloreto de polialilamina (PAH); (B) polietilenoimina (PEI) e (C) ácido poli(vinil sulfônico) (PVS).



Fonte: Adaptado de Santos (2009); Ricardo (2009); Almeida (2017)

3.4.7 CCA plus

O programa CCA+ (do inglês *Convex Constraint Analysis plus*) foi desenvolvido por Perczel e Fasman (1992) objetivando a deconvolução de espectros

de dicroísmo circular (CD) para estimar a estrutura secundária de proteínas e aplicado para estimar o número de espécies que coexistem em equilíbrio na solução. Neste trabalho o programa CCA foi utilizado para analisarmos os espectros de absorção ótica e dicroísmo circular, a fim de caracterizar as diferentes espécies em equilíbrio em função da concentração do agente caotrópico e suas contribuições individuais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

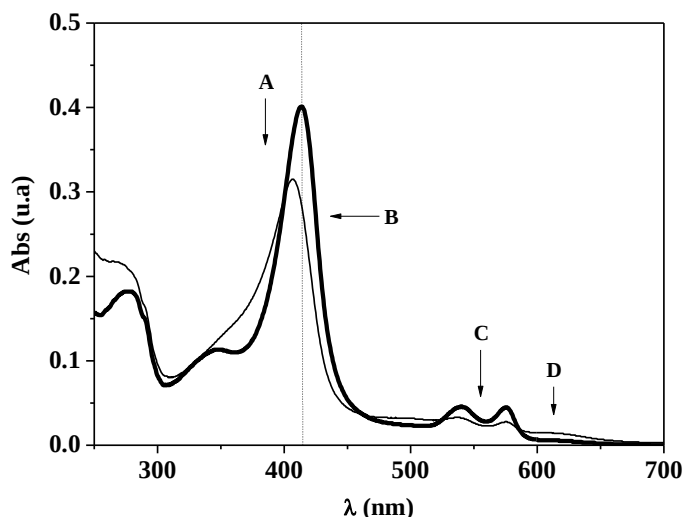
4.1 Interação da HbAg com cobre pH 5,0 e 7,0

4.1.1 Estudos por Absorção ótica

Vários estudos têm demonstrado que o espectro de absorção ótica de hemoglobinas extracelulares gigantes, como é o caso da HbAg, em sua forma íntegra (oxi), é caracterizado por uma banda intensa em 415 nm conhecida como banda de Soret. Além disso, outras duas bandas são observadas em 540 nm (α) e 575 nm (β), ambas com mesma intensidade e conhecidas como bandas Q (SANTIAGO *et al.* 2010; SANTIAGO *et al.*, 2008; BACHEGA, 2013; TABAK *et al.*, 2011). Estas informações ficam claramente demonstrada na Figura 14 referente a HbAg na sua forma oxi- no pH 7,0.

A hemoglobina, quando entra em contato com agentes caotrópicos como a ureia, metais pesados e/ou surfactantes pode sofrer oxidação e desta forma, promover uma alteração no centro férrico do grupo heme (CARVALHO *et al.*, 2013; CALISI *et al.*, 2011; POLI *et al.*, 2006). Nesses casos, o ferro responsável por se ligar reversivelmente com o oxigênio, se oxida e passa de Fe^{2+} para Fe^{3+} , perdendo a sua capacidade de ligação com o oxigênio de forma irreversível (CARVALHO 2013; BOWDEN *et al.*, 1985; BARROS *et al.*, 2015). Quando a hemoproteína encontra-se na forma meta (Ferro no estado 3^+) o espectro de absorção é caracterizado pelo deslocamento da banda de Soret para comprimentos de onda em torno de 405 nm, uma banda Q alargada com um máximo em 500 nm e há o surgimento de uma banda LMCT (transferência de carga ligante metal) na faixa de 620 nm (CARVALHO *et al.*, 2012). O espectro característico de uma hemoglobina em sua forma oxidada é ilustrado na Figura 14.

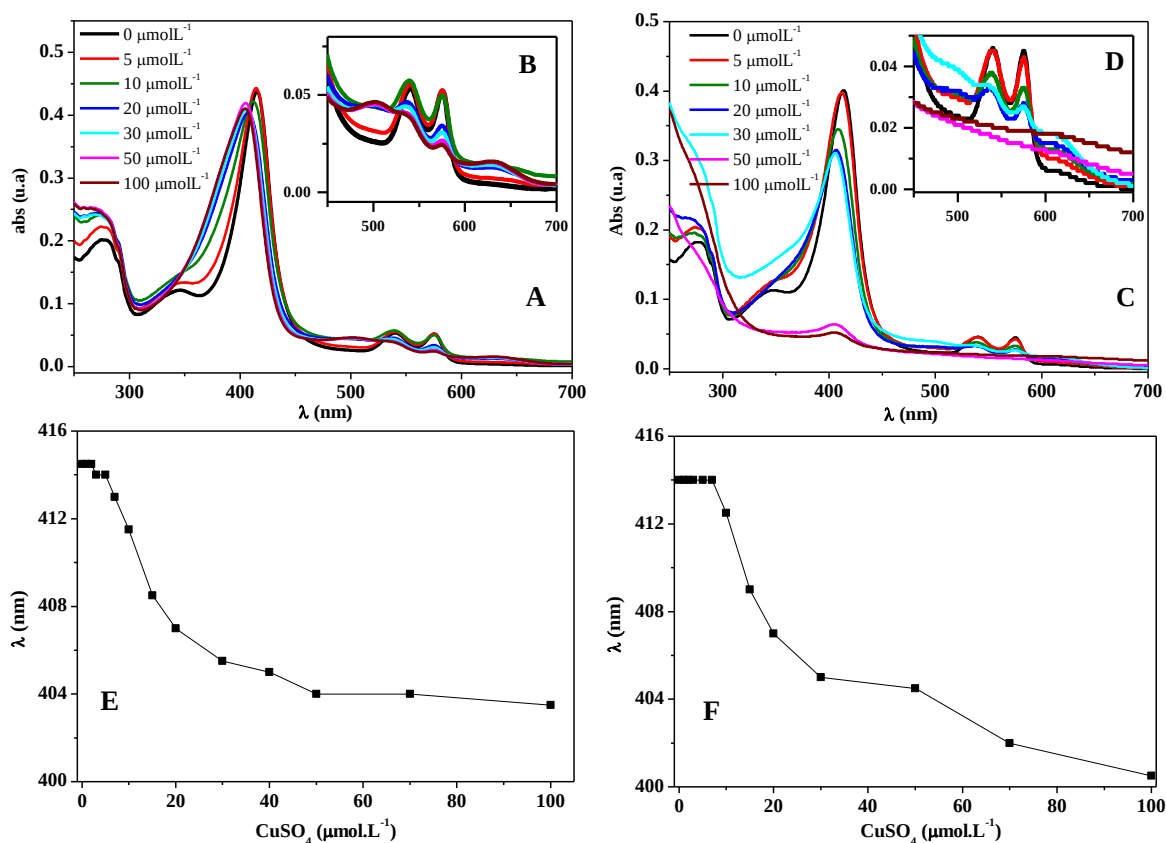
Figura 14. Espectro característico da HbAg em sua forma oxi no pH 7,0 (linha cheia) e espectro característico da proteína oxidada (linha fina). As setas “A” e “B” representam a diminuição da intensidade de absorção e deslocamento para a esquerda da banda de Soret, respectivamente. As setas “C” e “D” mostram o alargamento das bandas Q e o surgimento da banda LMCT, respectivamente. A linha tracejada mostra que a banda de Soret está centrada em 415 nm.



A Figura 15 mostra o comportamento dos espectros de absorção óptica para amostras preparadas em pH 5.0 (A) e pH 7.0 (D) na ausência e na presença do metal pesado cobre. Em (C) e (F) são apresentados os comprimentos de onda (λ) máximos da banda de Soret para o pH 5.0 e 7.0, respectivamente. Em (B) e (E) temos os destaques das bandas Q. O aumento nas concentrações de cobre provoca um significativo deslocamento do máximo da banda de Soret para menores λ , para ambos os valores de pH analisados.

Observa-se também, que ocorre um alargamento das bandas Q tendendo a formação de um único ombro, que também são características de oxidação da hemoproteína, o que está de acordo com os resultados apresentados por BARROS e colaboradores (2015) em estudos de efeitos desnaturantes na HbGp monitorado por sondas e SANTIAGO e colaboradores (2007) em estudos com a HbGp e surfactantes iônicos (SDS e CTAC). Além disso, na concentração de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ocorre o aparecimento de uma banda em torno de 620 nm, banda LMCT, que, segundo BOFFI *et. al* (1999) e SANTIAGO *et al.* (2007), é característica de espécies que surgem como consequência do processo de oxidação da hemoproteína.

Figura 15. Espectros de absorção óptica da HbAg $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmolL^{-1} pH 5.0 (A) e pH 7.0 (D) em função da concentração de CuSO_4 explorada entre $0\text{-}100 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ em período de equilíbrio de 3 horas. Destaque para o deslocamento na região da banda de Soret em pH 5.0 (B) e pH 7.0 (E). (C) e (F) representam o deslocamento da banda de Soret no pH 5.0 e 7.0, respectivamente.



Os picos de absorção da banda de Soret sofrem grande deslocamento, saindo do comprimento de onda de 415 nm para um máximo em 400 nm, caracterizando a oxidação da proteína em contato com o metal (CARVALHO, F.A.O SANTIAGO, P.S. TABAK, M., 2012; SANTIAGO *et al.*, 2007).

Em (C) fica evidente que, no pH 7.0, o pico de Soret deslocou para 400 nm na presença da maior concentração de cobre analisada ($100 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$). No pH 5.0, esse deslocamento foi menor, em torno de 403 nm para a maior concentração. Essa diferença nos espectros para os diferentes valores de pH pode ser consequência do ponto isoelétrico da hemoproteína. Sabe-se que o ponto isoelétrico de uma proteína representa o valor de pH onde, na superfície da molécula, a carga líquida é zero (NELSON E COX, 2006). Experimentos como os de Santiago e colaboradores (2007), mostraram que as alterações da proteína em pH alcalino foram mais significativas em baixas concentrações de surfactante catiônico (CTAC) quando

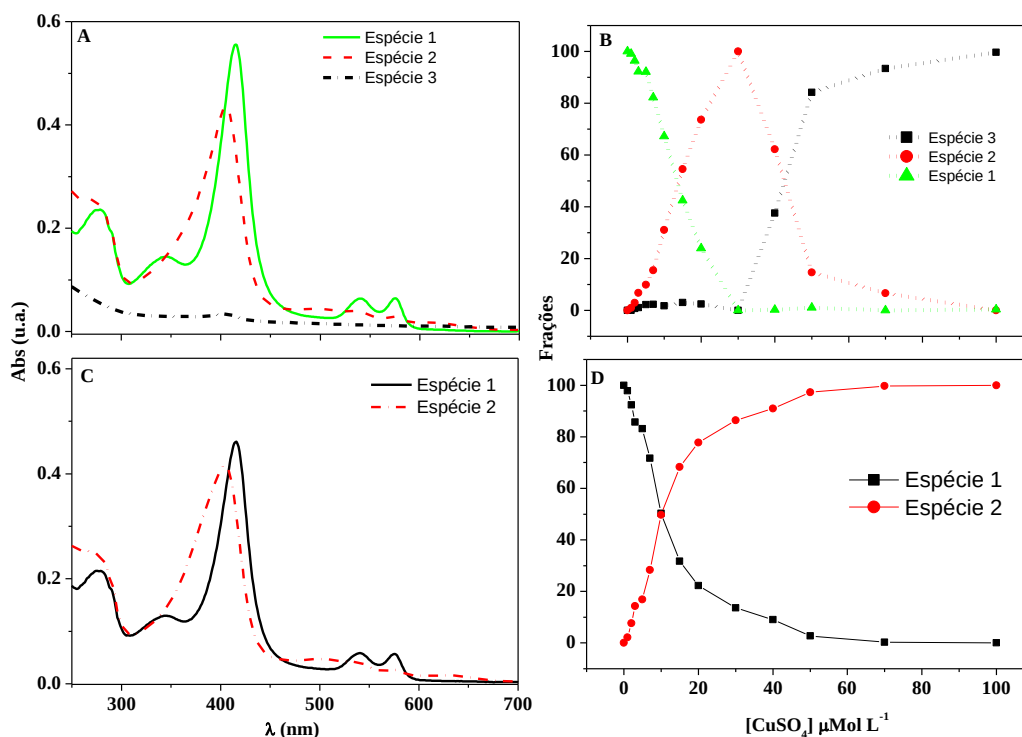
comparado ao aniônico (SDS), tendo como causa mais provável a interação eletrostática entre as cargas positivas do CTAC e as cargas negativas predominantes na superfície da proteína. Isso ocorre como consequência do pH estar acima do ponto isoelétrico, que para a HbGp é 5.6 (SANTIAGO, 2010). Estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa com a HbAg, estimaram que o seu ponto isoelétrico encontra-se no pH 6,0 (OLIVEIRA *et al.*, 2017) Desta maneira, no pH 7.0, ocorre predominância de cargas negativas na superfície da proteína, aumentando sua capacidade de interação com Cu^{2+} (SANTIAGO *et al.*, 2007).

A concentração de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ torna-se bastante importante para o estudo em questão, pois, a partir dessa concentração ocorre uma grande diminuição na intensidade de absorção da banda de Soret, indicando, indiretamente, a diminuição da concentração de proteína presente em solução. Essa diminuição é, provavelmente, consequência da formação de agregados HbAg-Cu. Assim, $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cobre é a concentração em que os agregados não estão suficientemente pesados para sedimentar em solução.

A análise dos dados de absorção óptica da HbAg em função da concentração de Cobre pelo método CCA plus, resultou em um equilíbrio de três espécies diferentes em função da concentração do referido metal. Assim, todo o conjunto de espectros de absorção óptica mostrados na Figura 15 foram deconvoluídos através do programa CCA plus, mostrando que, em pH 7.0 (Figura 15A e 15B) existem a presença de três espécies distintas em solução: proteína livre, agregado de proteína-Cobre e complexo proteína-cobre Já no pH 5.0 (C e D), apenas duas espécies foram observadas: proteína livre e complexo proteína-cobre.

Na figura 16 (A) e (B) são representadas as três espécies da proteína encontradas para as diferentes concentrações do metal em pH 7.0. A primeira espécie, proteína livre, caracteriza a forma oxy- da proteína. Entretanto, essa espécie tende a diminuir quantitativamente à medida que as concentrações do metal vão aumentando.

Figura 16. Análise por *Convex Constraint Algorithm* (CCA) do conjunto de espectros mostrados nas figuras 13. (A) e (C) correspondem aos espectros de absorção ótica das espécies puras obtidas por CCA, correspondendo aos valores de pH de 7,0 e 5,0 respectivamente. (B) e (D) correspondem à proporção das espécies em solução conforme o aumento da concentração do metal, para valores de pH de 7,0 e 5,0, respectivamente.



A partir da concentração crítica de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$, observa-se o máximo da formação de uma espécie intermediária (agregado de proteína–cobre), como consequência da oxidação da hemoglobina promovida pelo metal. A terceira espécie, presente é encontrada em amostras com concentrações elevadas do metal. Nos dois valores de pH analisados há o surgimento de uma banda em 500 nm característica de espécies oxidadas (VITAGLIANO, et al., 2004; AGUSTINHO, et al., 1997).

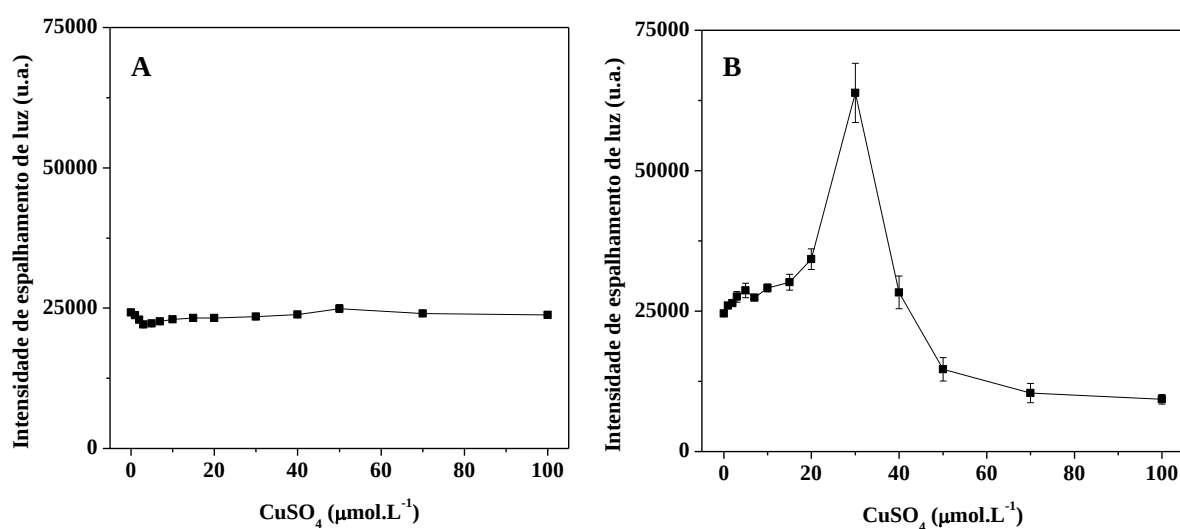
4.1.2 Espalhamento de Luz

O espalhamento de luz (do inglês *Light Scattering Intensity*, ou LSI) é resultante da indução de oscilações periódicas na nuvem eletrônica do campo elétrico oscilante da radiação incidente num átomo (SCHMITZ, 1990). Ao atravessar uma amostra, a radiação interage com a molécula. Assim, o instrumento registra o espalhamento causado pela molécula. Através de dados de espalhamento e da intensidade da radiação espalhada é possível obter-se dados sobre a dimensão das partículas

(SANTIAGO, 2008), tendo em vista que o espalhamento de luz é diretamente proporcional ao volume da partícula ao quadrado.

Na Figura 17 são apresentadas as intensidades de espalhamento de luz da HbAg em função da concentração de cobre nos valores de pH 5,0 e 7,0 (A e B respectivamente).

Figura 17. (A) e (B) Intensidade de espalhamento de luz (LSI) da HbAg $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} em pH 5,0 e pH 7,0, respectivamente, em função da concentração de CuSO_4 explorada entre $0\text{-}100 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Autor

No pH 5,0 verificamos uma leve redução seguido de um ligeiro aumento na LSI, porém na concentração de $100 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cobre a intensidade de espalhamento é menor que a inicial, sugerindo uma pequena dissociação e/ou diminuição do tamanho das moléculas. Essa pequena diminuição na LSI está de acordo com dados de Santiago e colaboradores (2010) que mostra que a proteína quando está num pH menor que o seu pI pode sofrer uma redução no espalhamento de luz, pois as moléculas não estão agregadas. No pH 7,0 observamos um aumento de 3 vezes na intensidade de espalhamento, comparando a HbAg na ausência de cobre com a HbAg na presença de $30 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ do metal. Vale mencionar que as amostras no pH 7,0 foram centrifugadas antes de realizarmos as medidas de espectroscopia devido a presença de agregados proteína-metal que sedimentaram. Por isso, o aumento da LSI é devido a formação de agregados proteína-metal que ainda permaneceram em

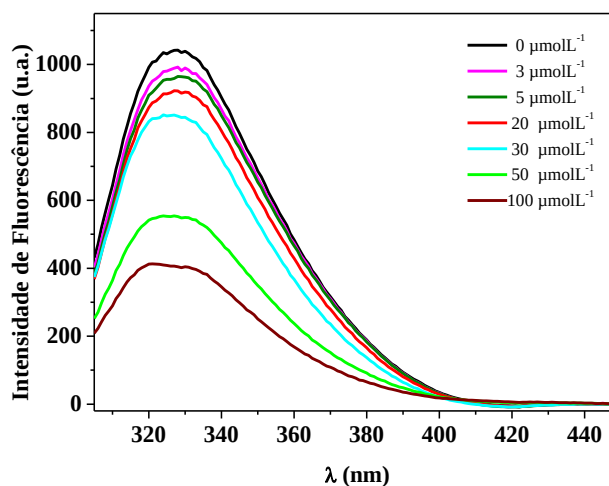
solução. Acima de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ observou-se uma diminuição da LSI o que pode ser associada a dissociação da HbAg. Dados de DLS (do inglês “*Dynamic Light Scattering*”) da HbGp no pH 7.0 e 9.0 em função do tempo e a 25°C , mostraram que o diâmetro hidrodinâmico (Dh) de 27 nm da HbGp na forma íntegra não se altera no pH neutro e diminui para 10 nm, após 24 horas de equilíbrio no pH 9.0, evidenciando o processo de oxidação e dissociação (SANTIAGO *et al.*, 2008). Em um outro estudo em pH 7,0 foi observado que adição de surfactantes provoca a dissociação da HbGp, diminuindo o Dh de 27 nm para 10 nm (CARVALHO J., 2013).

4.1.3 Estudos por Fluorescência

Na Figura 18 são apresentados espectros de fluorescência da HbAg na presença de cobre no pH 9,0. Como pode ser observado, a adição de cobre diminuiu a intensidade de fluorescência e deslocou o máximo da emissão para λ menor. Porém vale salientar que, considerando o apresentado pelos espectros de absorção e as informações levantadas na literatura para outras hemoglobinas (BARROS, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2010) quando a proteína se oxida, o processo de dissociação é induzido e acelerado. Assim, a intensidade de fluorescência aumenta devido a maior exposição do triptofano ao solvente. Porém, nos resultados apresentados na Figura 17 são observados fenômenos contrários.

A supressão de fluorescência refere-se aos processos energéticos que competem com a emissão de fluorescência resultando na variação da intensidade de fluorescência de uma dada substância (Lakowitz, 2006). Sabe-se que o cobre é um metal paramagnético e supressor de fluorescência, pois possui elétrons desemparelhados na sua camada de valência. Assim, através do estudo de fluorescência, não foi possível observar os efeitos do metal na hemoproteína devido a essa supressão. Caso a dissociação da HbAg na presença de cobre fosse observada, haveria uma maior exposição do triptofano ao solvente, e, portanto, uma maior intensidade de fluorescência seria destacada, como mencionado anteriormente. Porém, a supressão de fluorescência da HbAg provocada pela presença do cobre foi mais significativa do que o aumento da fluorescência decorrente da provável dissociação como observado na Figura 16. Desta forma, não foi possível utilizar a técnica de fluorescência em nossos estudos para verificar a dissociação da hemoproteína pelo metal pesado cobre.

Figura 18. Espectros de fluorescência da HbAg, $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, com adição crescente de concentrações de CuSO_4 ($0\text{-}100 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$) em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L^{-1} pH 9,0.



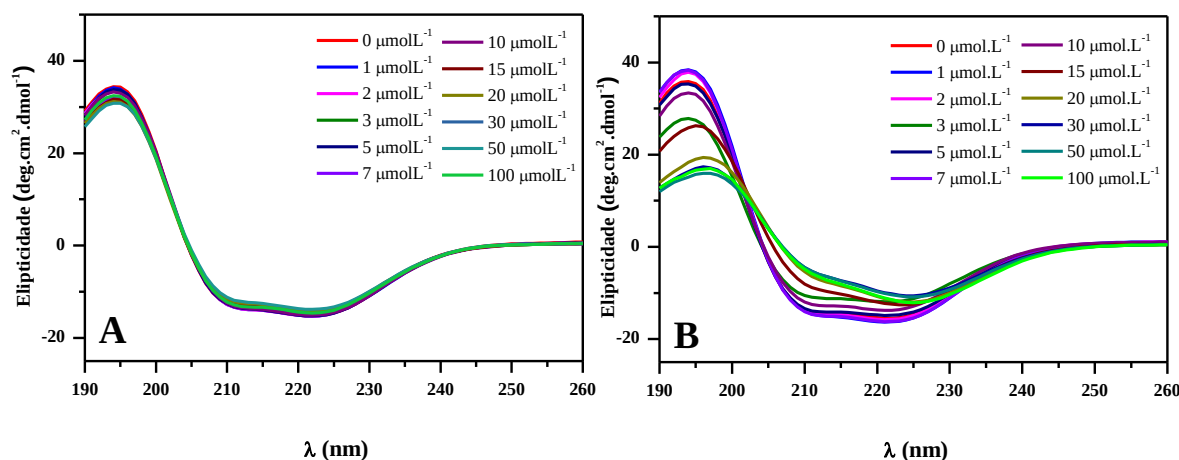
4.1.4 Dicroísmo Circular

O espectro de dicroísmo circular da HbAg no pH 7,0 é caracterizado por dois picos negativos de elipticidade um em 208 nm e outro em 220 nm (α -hélice), além de um pico positivo em 198 nm (aminoácidos), como mostra Figura 19. Este resultado está de acordo com os espectros de Dicroísmo Circular (CD) descritos para outras hemoglobinas gigantes (CARVALHO, 2013; POLI, A.L., MOREIRA, L.M., IMASATO, H. 2011).

Um estudo sobre a estabilidade da oxi-HbGp, Carvalho (2013) mostra que com o aumento de temperatura, a intensidade de elipticidade mantém-se praticamente estável até 50°C na região das ligações peptídicas. Em temperaturas maiores do que 50°C ocorre a perda acentuada de elipticidade devido a desnaturação da proteína.

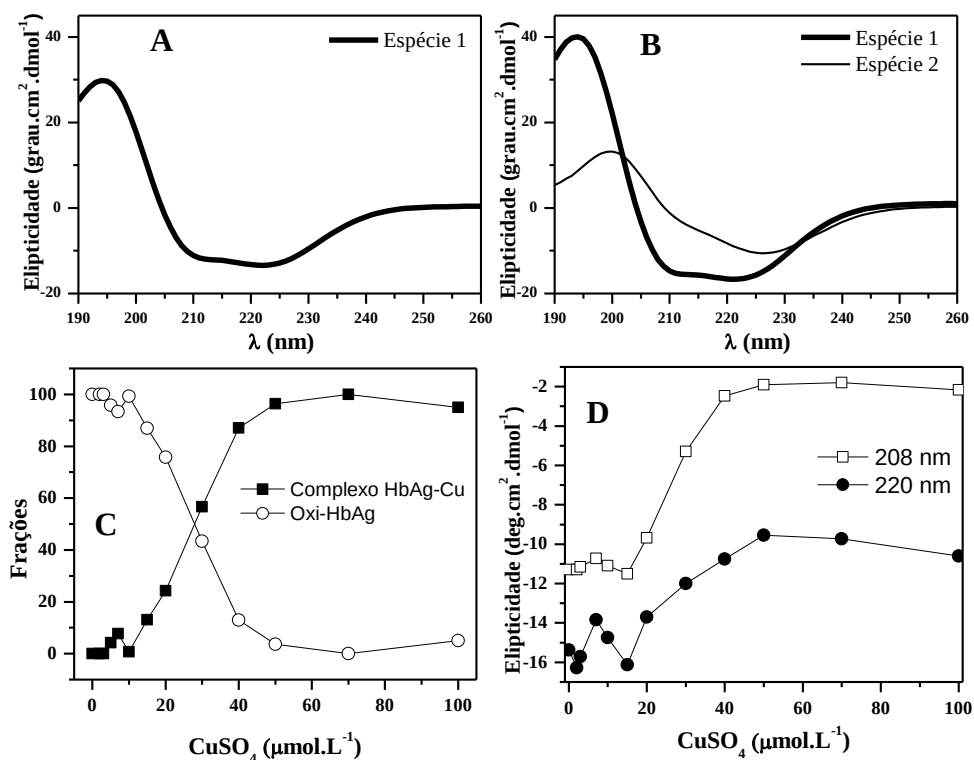
Os espectros de dicroísmo circular das amostras de HbAg na presença de diferentes concentrações de cobre nos valores de pH de 5,0 e 7,0 estão mostrados na Figura 19A e 19B, respectivamente.

Figura 19. Espectros de CD da HbAg $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em tampão fosfato 20 mmol.L^{-1} no pH 5,0 (A) e pH 7,0 (B), em função da concentração de CuSO_4 na faixa de $0\text{-}100 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Os espectros de dicroísmo circular das amostras de HbAg na presença do metal pesado nos valores de pH 5,0 e 7,0 apresentados na Figura 19 foram deconvoluídos pelo software CCA plus e mostrados na Figura 20.

Figura 20. Análise por *Convex Constraint Algorithm* (CCA) do conjunto de espectros mostrados na figura 17. (A) e (B) correspondem aos espectros de dicroísmo circular das espécies puras obtidas por CCA, correspondendo aos valores de pH de 5,0 e 7,0 respectivamente. (C) mostra as frações das componentes obtidas pelo CCA para a HbAg no pH 7,0 da Figura 17B. (D) representa os valores de elipticidades em 208 e 220 nm da HbAg em 7,0.



Na figura 20A observa-se que a HbAg, pH 5,0, na ausência e na presença de diferentes concentrações de sulfato de cobre (A), existe uma única espécie em equilíbrio. Este resultado pode sugerir que, no valor de pH 5,0, a hemoproteína se oxida (conforme mostrado nos espectros de absorção óptica na Figura 15) mas não perde a estrutura secundária na presença de cobre. Comparando os resultados de CD no pH 5,0 com os de LSI verifica-se que a HbAg dissocia-se parcialmente e não agrega-se. Na figura 20B observa-se que a HbAg, pH 7,0, na ausência e na presença de diferentes concentrações de sulfato de cobre, coexistem duas espécies em equilíbrio, a espécie 1 é associada a proteína livre e a espécie 2 corresponde ao complexo proteína-cobre.

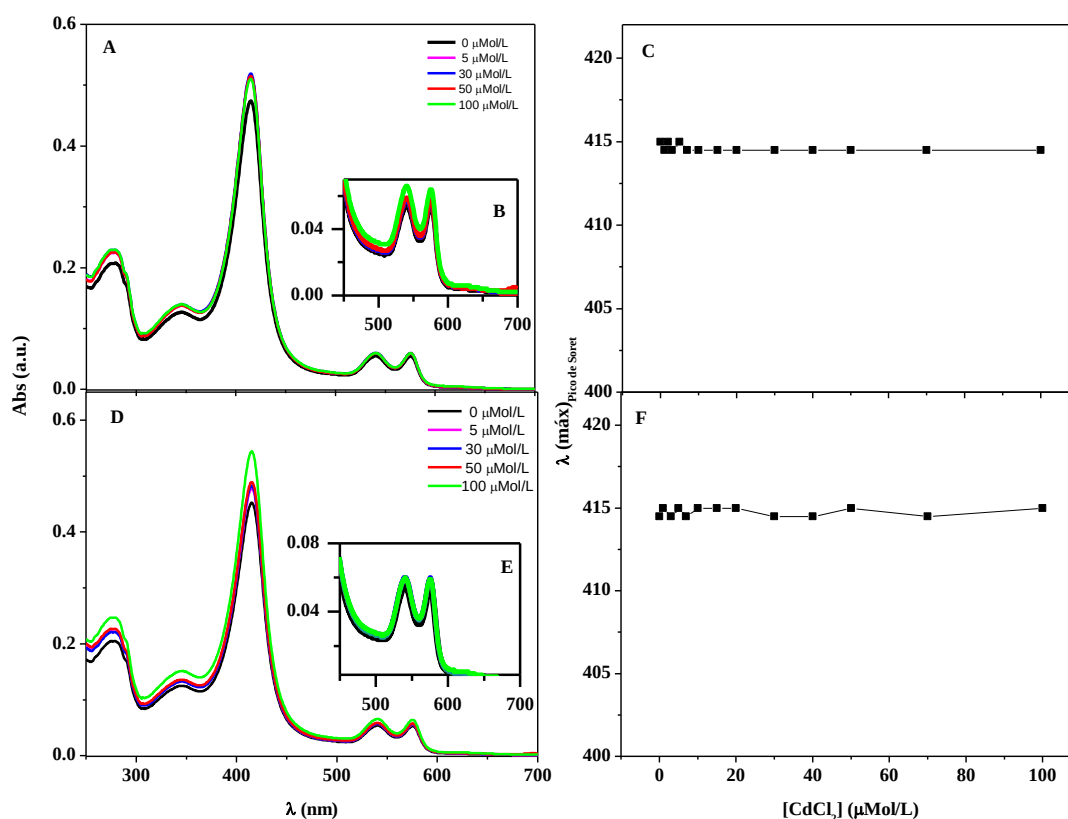
Em seu trabalho, Carvalho (2013) mostra que a ureia em concentrações acima de 4 mol.L⁻¹ desnatura a HbGp, o autor indica que a elipticidade da região do grupo heme e das ligações peptídicas chegam próximo de zero, indicando a desnaturação da hemoglobina. A adição de cobre, na HbAg em pH 7,0, diminui o valor da elipticidade na banda em 195 nm, banda está referente aos aminoácidos (Figura 19B) e, paralelamente, há uma aumento na banda referente às α -hélices em 208 nm (20C), que chega próxima de zero, evidenciando uma perda das estruturas de α -hélices.

4.2 Interação da HbAg com cádmio

A Figura 21 apresenta os espectros de absorção óptica da HbAg, pH 5,0 e 7,0, na presença de diferentes concentrações de cloreto de cádmio. Neste resultados observa-se que a adição de CdCl₂, para ambos os valores de pH, não provoca um deslocamento da banda de Soret. Ressalta-se, também, que não ocorreu alargamento significativo das bandas Q, além do não surgimento da banda LMCT decorrentes da adição de cádmio, fatos estes que podem sugerir que a HbAg não se oxidou na presença de cádmio. As únicas mudanças observadas nos espectros de absorção óptica da HbAg na presença de diferentes concentrações de cádmio foram variações nas intensidades de absorção, tanto no pH 5,0 quanto pH 7,0, como pode ser observado na Figura 21. Vale salientar que na presença de cádmio não houve formação da banda LMCT, diferente do que aconteceu com o cobre. A ausência desta banda é outro indicativo de que a HbAg não sofreu forte oxidação na presença de cádmio nas condições em que o experimento foi conduzido. Dessa maneira, os resultados obtidos por absorção óptica da HbAg na presença de diferentes

concentrações de cádmio levam a crer que o processo de oxidação da hemoproteína não ocorreu .

Figura 21. Espectros de absorção óptica da HbAg na presença de diferentes concentrações de CdCl_2 em pH 7,0 (A) e pH 5,0 (D). Nos incisos (B) e (E) destaca-se as bandas Q. Em (C) e (F) são mostrados os deslocamentos dos máximos da banda de Soret para pH 7,0 e 5,0, respectivamente.



Entretanto, Calisi e colaboradores (2011) observaram a presença de Meta-hemoglobina, após analisar o sangue de minhocas que entraram em contato com o metal Cádmio. O experimento descrito por Calisi (2011) foi realizado separando-se as minhocas em grupos e colocando-as em contato com soluções de sulfato de cobre, outras com cloreto de cádmio e outras com cloreto de mercúrio em diferentes concentrações. Depois de 48 horas de contato com os metais, o sangue das minhocas foi extraído e analisado. Essa diferença nos resultados entre o citado e o presente trabalho pode ser explicada pelo fato do experimento realizado pelos autores ter sido feito *in vivo*. Assim, no estudo de Calisi (2011) o metal entrou em contato com os animais como um todo, e, portanto, o sistema que compreende o mecanismo de interação entre a hemoglobina e o metal estava submetido a um meio

muito mais complexo, enquanto que o presente experimento foi realizado *in vitro*, com a proteína extraída e purificada.

Tendo em vista que a HbAg não sofreu alterações significativas na presença de cádmio, propõem-se duas hipóteses para tal fato. Hipótese i): *Ligação de Cisteína com o metal pesado Cádmio*. Bachega e colaboradores (2013), em seu trabalho com a HbGp (proteína ortóloga a HbAg), utilizando técnicas de cristalografia, descreve que a HbGp é rica em resíduos de cisteína, os quais são responsáveis pelas ligações dissulfeto entre subunidades. De forma semelhante, Kao et al (2006) citam que a hemoglobina extracelular de (HbLt) também possui resíduos de cisteína em sua estrutura, assim como Royer et al (2000) descrevem que outras minhocas do gênero *Lumbricus* dispõem da mesma característica. Arias e Santos (2008) ressaltam a importância que as cisteínas presentes nas metalotioneínas (MT) exercem na resposta dos organismos contra metais pesados. MT são proteínas ligantes de metais devido à abundância de cisteína em sua estrutura (KÄGI,1993), e são capazes de se ligar a metais como Zn(II), Hg (II), Cu (I) e Cd (II) tanto *in vivo* quanto *in vitro* através de pontes e terminais com enxofres nos grupos sulfidrilas das cisteínas.

Desta forma, a HbAg pode ser rica nos compostos de cisteínas, e esta pode interagir preferencialmente com o metal pesado cádmio ao invés de favorecer a oxidação do grupo heme, explicando os resultados obtidos.

Hipótese ii) *A segunda hipótese gira em torno da possibilidade do Cd^{2+} agir como agente de reassociação da proteína, aumentando a estabilidade oligomérica da HbAg*. Sharma e colaboradores (1996) em seu trabalho com hemoglobina de *Lumbricus terrestris*, verifica que cátions bivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Sr^{2+} podem ajudar no processo de reassociação da hemoproteína. Tal fato é corroborado por Bonafe e colaboradores (1990) que analisaram amostras de HbGp na presença e na ausência de cálcio, constatando uma reassociação parcial da hemoglobina na presença desse elemento. Tendo em vista que o cloreto de cádmio, após a sua dissociação, dá origem a um cátion bivalente (Cd^{2+}), este pode ocasionar uma maior estabilidade e/ou reassociação da estrutura da HbAg, de forma semelhante ao que acontece com o cálcio e magnésio. Porém, estudos relacionados a essa interação na HbAg ainda se faz necessário para confirmar esse processo.

No apêndice A encontram-se os dados de fluorescência, espalhamento de luz e dicroísmo circular da HbAg na presença de diferentes concentrações de cádmio

(0-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) no pH 5,0 e 7,0. Nota-se que não há alteração na estrutura secundária da proteína e nem mudanças no espalhamento de luz para nenhum dos valores de pH explorados.

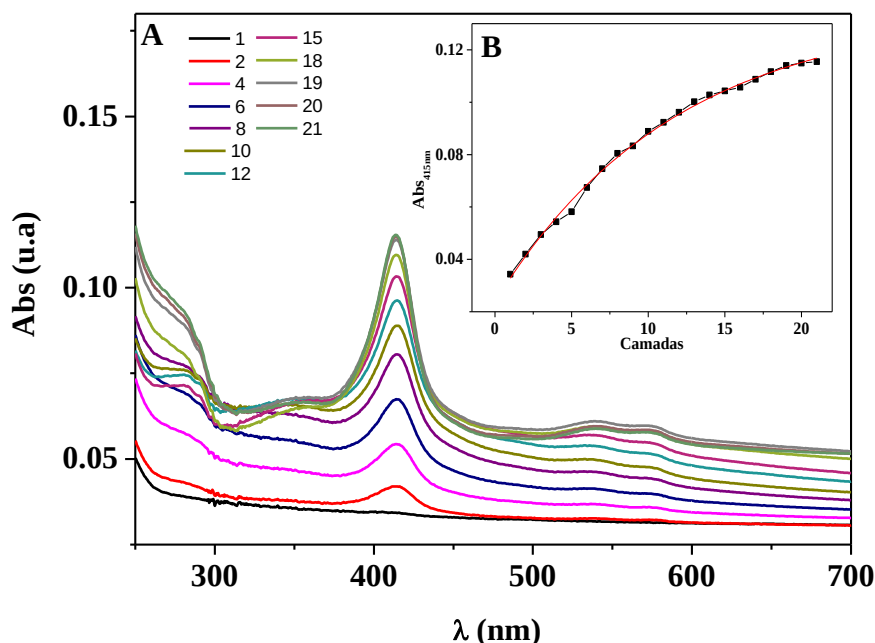
4.3 Crescimento dos filmes no substrato

Os métodos mais comuns para a preparação de filmes de polímeros homogêneos são os métodos de *casting* (espalhamento), *spin coating* (espalhamento rotativo) e automontagem *layer-by-layer* (camada por camada) (DECHER et al., 1991). No presente trabalho foi utilizado o método de automontagem *layer-by-layer*, alternando as camadas de polímero e hemoglobina.

Para o teste do crescimento das bicamadas no substrato (quartzo) foram utilizados 3 polímeros distintos: Polietilenoimina (PEI), polialilamina hidrocloreada (PAH) e polivinil sulfato de sódio (PVS) e dois valores de pH diferentes: 5,0 e 7,0. Os polímeros testados para a imobilização foram o PEI e o PAH, já o PVS foi o polímero selecionado para as amostras branco. O crescimento dos filmes HbAg-biopolímero não foi eficiente com o polímero PAH, em nenhum dos valores de pH explorados, o resultado encontra-se no apêndice B. Já o crescimento com o PEI em pH 5,0 (Apêndice C) também não foi eficiente devido ao pI da proteína ser em torno de $6,0 \pm 0,3$. Nesse pH as cargas superficiais da proteína são positivas e desta forma não há a interação com o biopolímero PEI que também possui carga superficial positiva.

Na Figura 22 podemos observar o crescimento das camadas de PEI/HbAg em pH 7,0 monitorado por absorção ótica. O espectro de absorção ótica característico da hemoglobina descrito anteriormente está bem definido e mostra que a proteína se encontra em sua forma íntegra (banda de Soret centrada em 415 nm). O crescimento da bicamada PEI/HbAg em pH 7,0 foi realizado com até vinte e uma deposições e monitorada na região do UV-Vis com varredura de 700 a 250 nm. Desta forma, fica evidente que a HbAg adsorve a cada camada do PEI sendo este adequado para a fabricação do filme fino PEI/HbAg em pH 7,0. Este teste foi realizado a fim de verificar o biopolímero ideal para ser utilizado na imobilização da hemoglobina. Os ensaios da interação do filme com cobre seguiram com 10 bicamadas PEI/HbAg pois é a quantidade de camadas em que o cobre não entra em contato com a superfície do substrato.

Figura 22. (A) Espectros UV-Vis dos filmes PEI/HbAg após a deposição de vinte e uma camadas em pH 7,0 no substrato de quartzo. (B) Monitoramento da intensidade de absorção em 415 nm de cada um dos filmes crescidos de PEI/HbAg com ajuste para verificar sua linearidade.



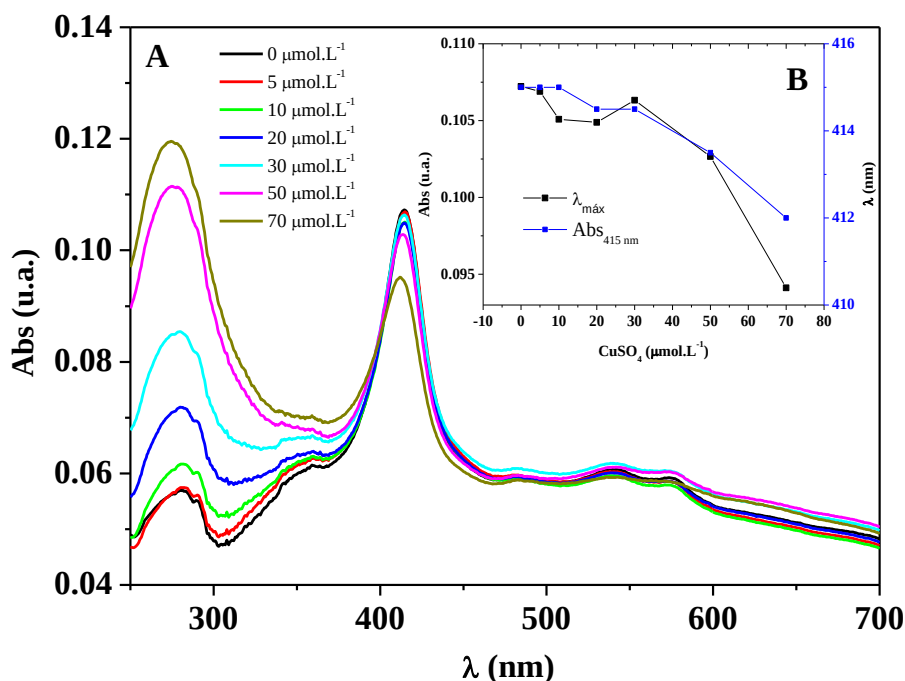
Para o teste branco o filme foi montado alternando camadas de PEI e PVS. No apêndice D(A) está apresentado os espectros de absorção ótica referente ao crescimento de PEI/PVS com 6 bicamadas. O PVS é um polímero aniônico que se liga ao PEI (catiônico) também por ligações eletrostáticas. Neste experimento ele foi utilizado para simular a interação da HbAg com o polímero.

4.4 Interações com cobre

Os filmes contendo 10 bicamadas de PEI/HbAg em pH 7,0 foram expostos a concentrações crescentes de sulfato de cobre (CuSO_4), na faixa de 0 a $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do metal pesado. Na figura 23 podemos verificar a interação da proteína com o metal devido a oxidação da HbAg. Nota-se que a oxidação é acentuada a partir de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cobre, como podemos observar na Figura 23 (B) e que está de acordo com os dados de absorção ótica em solução, mostrados anteriormente. A banda de Soret é deslocada para menores comprimentos de onda, a intensidade máxima de absorção decresce e ainda há um alargamento da banda de Soret.

Observa-se ainda um ligeiro alargamento das bandas Q, sugerindo oxidação da proteína (SANTIAGO *et al.*, 2007).

Figura 23. (A) Espectros de absorção ótica do filme crescido com PEI/HbAg em contato com concentrações crescentes de sulfato de cobre exploradas entre 0 e 70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do metal. (B) Monitoramento do deslocamento da intensidade de absorção ótica da banda de Soret e da absorção máxima em 415 nm.



Foi realizado paralelamente um experimento do filme PEI/HbAg com apenas 1 bicamada e o resultado (Apêndice D) mostra que apenas uma bicamada não é suficiente para a detecção ótica, desta forma, a interação com o metal pesado não é observada. Quando colocamos apenas uma bicamada no substrato, a cobertura com o filme não é totalmente uniforme, deixando lacunas e interferindo na detecção.

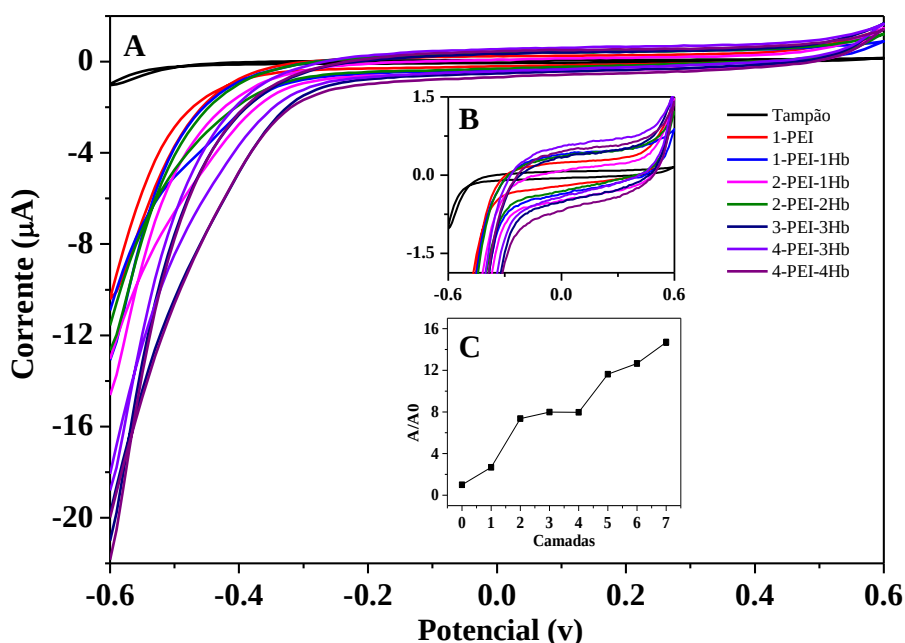
4.5 Crescimento e interação com cobre dos filmes no eletrodo

Após as análises espectroscópicas dos filmes foi verificado que o cobre oxida a HbAg imobilizada no quartzo e que, a partir de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, há uma oxidação abrupta. Porém, para a fabricação de biossensores, deve ser observada a sensibilidade da hemoglobina para o metal, verificando quais as concentrações o sensor pode detectar.

Foi utilizada a técnica de voltametria cíclica para averiguar essa sensibilidade da hemoproteína ao cobre. A voltametria cíclica é a técnica mais utilizada para adquirir características qualitativas/quantitativas e informações sobre reações eletroquímicas, e em muitas vezes é o primeiro experimento realizado em um estudo eletroanalítico. Ela oferece uma localização rápida dos potenciais redox das espécies eletroativas da amostra (Wang, 2006).

Sabendo disso, foram crescidas quatro bicamadas em um eletrodo impresso de carbono (modelo DRP-110 da DropSens), como mostra a Figura 24. Deve-se notar que a área do voltamograma aumenta à medida que as camadas vão se sobrepondo, evidenciando assim o crescimento do filme.

Figura 24. (A) Voltametria cíclica dos filmes crescidos com camadas de PEI/HbAg com a variação dos potenciais de -0,6 a 0,6 volts em tampão fosfato 20 mmolL⁻¹, pH 7,0. (B) Ampliação da área do crescimento dos filmes. (C) Área normalizada dos voltamogramas apresentados em Figura 23A.

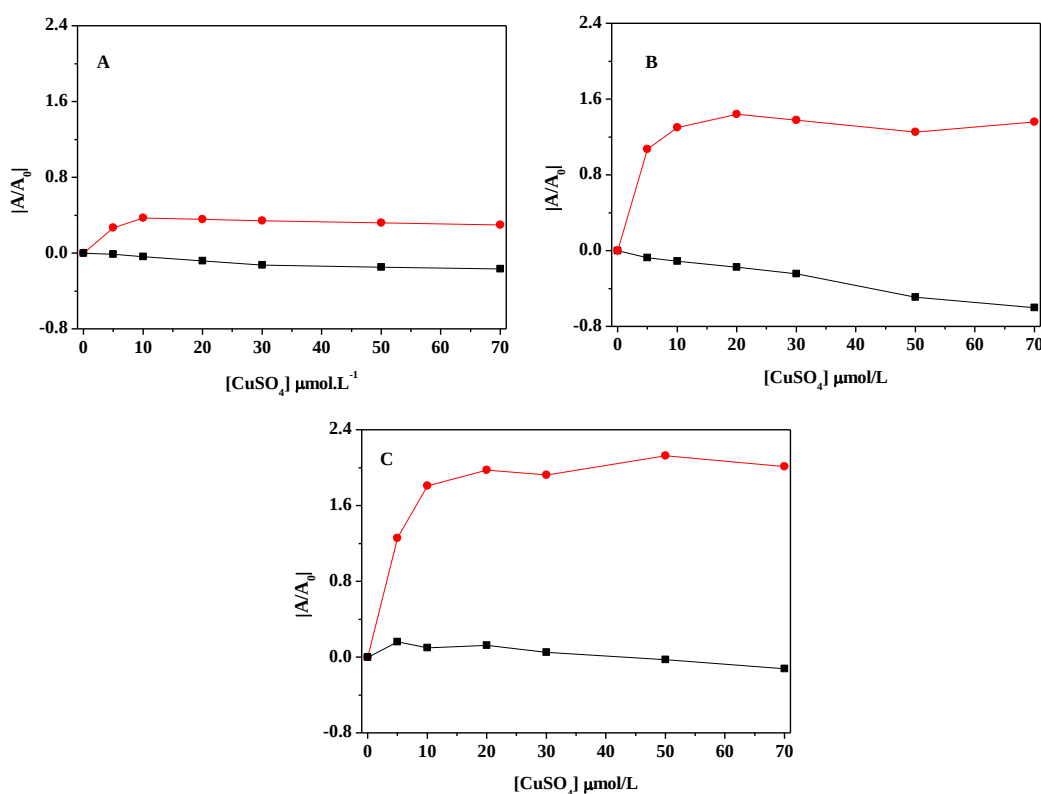


Após esta etapa, foi iniciada a interação do filme imobilizado no sensor com as concentrações de cobre que vão de 0 a 70 µmol.L⁻¹, variando o número de camadas a serem depositadas, afim de verificar qual seria a melhor condição para o crescimento dos filmes e interação com o metal pesado.

A Figura 25 mostra a área normalizada $|A - A_0|$ ($A - A_0$ em módulo) de 6 sensores com diferentes bicamadas (três sensores com filmes de PEI/HbAg e três sensores com filmes de PEI/PVS contendo 1, 5 e 10 bicamadas, figuras 25 A, B e C,

respectivamente). Essa quantidade de camadas foi definida, pois, com menos de 10 camadas, percebemos que o sinal no voltamograma era do metal e não da interação do cobre-proteína. Isso pode ter ocorrido porque com menos camadas o filme fica mais poroso e assim, o metal adsorve no sensor.

Figura 25. Área normalizada $[A - A_0]$ dos voltamogramas decorrentes da interação dos filmes crescidos de PEI/HbAg e PEI/PVS com cobre em 3 diferentes bicamadas: 1, 5 e 10 bicamadas (A, B e C, respectivamente).



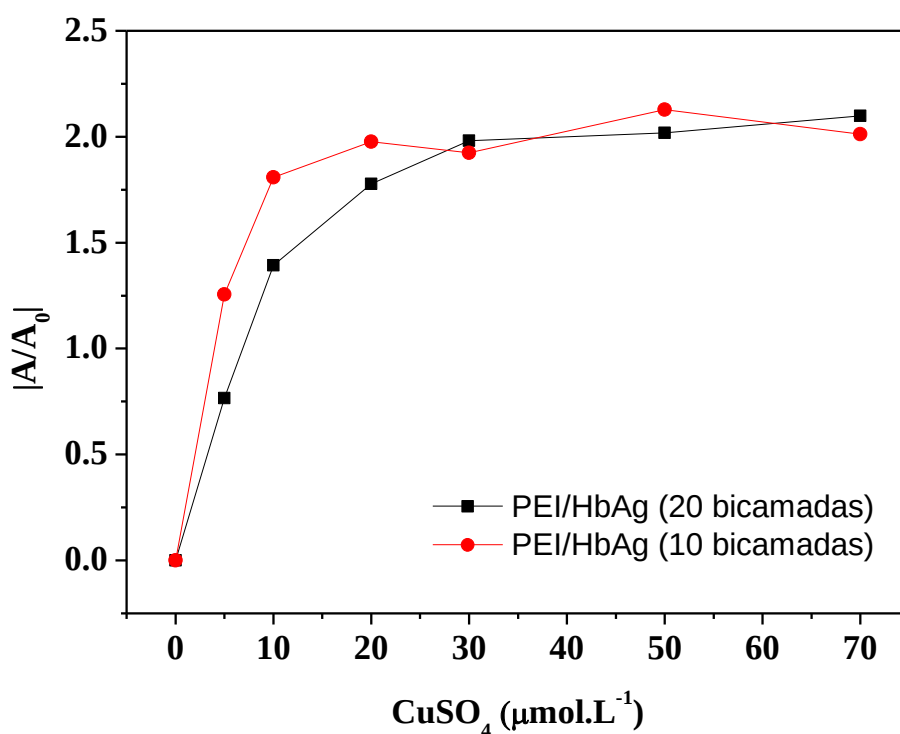
Na Figura 25 (C) pode ser observado que a inclinação dos pontos referentes ao sensor de PEI/HbAg com 10 bicamadas é maior. Quando essa inclinação é maior (coeficiente angular maior), há uma maior sensibilidade para a detecção, desta forma o sensor de 10 bicamadas de PEI/HbAg se mostrou mais sensível ao cobre do que os outros testados. Os sensores com 1 e 5 bicamadas também apresentaram adsorção do metal, porém com menores mudanças na inclinação da curva. Note que os sensores na ausência da hemoglobina (PEI/PVS) não apresentaram grandes variações na área do voltamograma, indicando que o metal adsorve, neste caso, especificamente com a hemoglobina.

Uma diferença significativa de área foi observada até 20 $\mu mol.L^{-1}$ e após esta concentração de cobre o eletrodo é saturado. Este resultado corrobora com os

resultados obtidos por absorção ótica da interação da HbAg em solução com cobre, mostrados na Figura 15, onde observa-se uma oxidação da hemoglobina após $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Outro ensaio foi conduzido com o intuito de verificar se a diferença de área poderia aumentar com a adição de mais bicamadas. A Figura 26 mostra dois sensores (PEI/HbAg com 10 e outro com 20 bicamadas), onde observa-se que com 10 bicamadas o coeficiente angular ainda é maior, portanto, mais sensível ao cobre. Essas mudanças estão relacionadas à densidade eletrônica das moléculas com o metal, devido a aproximação do metal com a proteína. Todavia, o comportamento do sensor com 20 bicamadas é mais sistemático, e com melhor definição.

Figura 26. Área normalizada dos voltamogramas decorrentes da interação dos filmes crescidos de PEI/HbAg com 10 e 20 bicamadas.



5. CONCLUSÕES

O presente trabalho evidencia, através dos espectros de absorção ótica, que a interação da HbAg com o metal pesado cobre promoveu a oxidação da proteína. Como os estudos foram realizados em valores de pH 7,0 e 5,0, acima e abaixo do pI da HbAg. No pH 5,0 a proteína encontra-se carregada positivamente, por isso esta não interagiu fortemente com o metal pesado Cobre, quando comparada com a HbAg pH 7,0 (cargas majoritárias negativas). A concentração de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cobre foi considerada uma concentração crítica que promove a oxidação e dissociação da HbAg. Através dos resultados de dicroísmo circular, conseguimos verificar que a hemoglobina em pH 5,0 se oxida mas não perde sua estrutura secundária, já com o pH 7,0 ela perde parcialmente suas α -hélices.

A HbAg na presença de Cádmio não apresentou mudanças significativas nos espectros de absorção ótica, no espalhamento de luz, fluorescência e nem nos espectros de dicroísmo circular para nenhum dos valores de pH analisados e na faixa de concentração de Cádmio estudada ($0 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os resultados podem indicar que o cádmio atue impedindo a dissociação da hemoproteína ou reassociando-a, ou ainda, que o Cadmio se liga inicialmente com os sítios de Cisteínas. Porém, mais estudos observando a interação da hemoglobina com esse metal devem ser realizados a fim de concretizar nossas hipóteses. Como é o caso do DLS, SAXS e outras técnicas biofísicas.

A imobilização da hemoproteína com PEI em pH 7,0 manteve as propriedades físicas da hemoglobina, que é um fator muito importante para a fabricação de um biossensor. Já a imobilização em pH 5,0 não foi efetiva. O polímero PAH não foi eficiente para a imobilização da HbAg em nenhum dos valores de pH analisados.

A interação com cobre no sensor avaliado por voltametria cíclica demonstrou a sensibilidade do método, verificando a oxidação da hemoproteína em concentrações de cobre abaixo de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Estes resultados são preliminares e serão melhores analisados nos ensaios posteriores, porém, é correto afirmar que a HbAg é sensível ao cobre em concentrações muito baixas, e, mesmo imobilizada num sensor com o auxílio do polímero PEI foi eficiente para detectar o cobre.

Esses dados indicam o uso da HbAg como biossensor para o metal pesado cobre, demonstrando sensibilidade ao metal.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo do presente trabalho foi alcançado, mostrando que a hemoglobina extracelular de *Amynthes gracilis* é sensível ao cobre, até em baixas concentrações. Desta forma, os estudos que serão realizados no projeto de doutorado do aluno Claudemir Oliveira Souza, dentre outros objetivos quantificarão a sensibilidade e a seletividade do sensor investigado.

Desta forma, estudos complementares devem ser realizados com outros metais a fim de verificar essa sensibilidade e seletividade, utilizando outras técnicas como voltametria de onda quadrada, além das técnicas espectroscópicas e elétricas mencionadas neste trabalho.

O estudo com a subunidade *d* desta hemoproteína como biossensor deve ser explorado, pois esta subunidade apresenta menor Massa Molar e com mais possibilidades de síntese para a produção em grande escala. Além disso, o monômero *d* é a subunidade mais fácil de separar da estrutura oligomérica da HbAg e, por possuir grupo heme e apresentar uma certa estabilidade, pode mostrar resultados similares com os apresentados neste trabalho. Desta forma, no projeto de doutorado, vamos iniciar os estudos desta subunidade com metais e pesticidas, além de estudos com a hemoglobina nativa visando a caracterização e a busca pelo biossensor de poluentes ambientais.

6. REFERÊNCIAS

- AGUSTINHO, S. C. M.; TINTO, M. H.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M.; IMASATO, H. 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.
- ALMEIDA, A.K.; **Preparação, caracterização e aplicação de filmes finos de PAH/PAA com nanopartículas de prata no tratamento Microbiológico de efluentes industriais para reuso**. 2017. 47 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2017.
- ANDREA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 2, n. 2, p. 95–107, 2010.
- ANH, T. M. DZYADEVYCH, S. V.; VAN, M. C.; RENAULT, N. J.; DUC, C. N.; CHOVELON, J. M. Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites. **Talanta**, v. 63, n. 2, p. 365–370, 2004.
- ARIAS, L. R. A.; SANTOS, V. G. Metallothionein: molecular and cellular processes. **Caderno Saúde Coletiva**, v. 16, n. 4, p. 701–716, 2008.
- ARRUDA, Izabela Gutierrez de. **Biossensores amperométricos fabricados a partir de eletrodos enzimáticos de polifenol oxidase para a detecção de pesticidas**. 2016. 89 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- ARTMANN, G. M.; BURNS, L.; CANAVES, J. M.; TEMIZ-ARTMANN, A.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W.; CHIEN, S.; MAGGAKIS-KELEME, C. Circular dichroism spectra of human hemoglobin reveal a reversible structural transition at body temperature. **European Biophysics Journal**, v. 33, n. 6, p. 490–496, 2004.
- BACHEGA, J. F. R. **Estrutura cristalográfica da hemoglobina gigante de Glossoscolex paulistus, um complexo de 3,6 mega Daltons**. 2013. 165 p. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física de São Carlos: Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- BACHEGA, J. F. R.; MALUF, F. V.; ANDI, B.; PEREIRA, H. D.; CARAZZOLLEA, M. F.; ORVILLE, A. M.; TABAK, M.; BRANDAO-NETO, J.; GARRATT, R. C.; REBOREDO, E. H. The structure of the giant haemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 71, p. 1257–1271, 2015.
- BOFFI, A.; DIAS, T. K.; LONGA, S.; SPAGNUOLO, C.; ROUSSEAU, D. L. Pentacoordinate hemin derivatives in sodium dodecyl sulfate micelles: model systems for the assignment of the fifth ligand in ferric heme proteins. **Biophysical journal**, v. 77, n. 2, p. 1143–9, 1999.

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

CARVALHO, F. A. O. **Estudo da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) por ultracentrifugação analítica e fluorescência em função do pH**. 2010. 126 p. Dissertação (Mestrado de em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos: Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010.

CARVALHO, F. A. O.; ALVES, F. R.; TABAK, M. Ionic surfactants-*Glossoscolex paulistus* hemoglobin interactions: characterization of species in the solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 670-681, 2016.

CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, n. 1, p. 340–348, 2013.

CARVALHO, J. W. P. *et al.* Thermal stability of extracellular hemoglobin of *Rhinodrilus alatus* (HbRa): DLS and SAXS studies. **European Biophysics Journal**, v. 45, n. 6, p. 549-563, 2016.

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

CHABASSE, C.; BAILLY, X.; SANCHEZ, S.; ROUSSELOT, M.; ZAL, F. Gene structure and molecular phylogeny of the linker chains from the giant annelid hexagonal bilayer hemoglobins. **Journal of Molecular Evolution**, v. 63, n. 3, p. 365-374, 2006.

CHAIRES, J. B. Calorimetry and thermodynamics in drug desing. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, p. 135-151, 2008.

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

DA SILVA, L. F.; CATTO, A. C.; AVANSI JR, W.; CAVALCANTE, L. S. MASTELARO, V. R.; ANDRÉS, J.; AGUIR, K.; LONGO, E. Acetone gas sensor based on α -Ag₂WO₄ nanorods obtained via a microwave-assisted hydrothermal route. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 683, p. 186–190, 2016.

DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232–1237, 1997.

DECHER, G.; HONG, J. D.; Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process .1. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. **Macromolecular Symposia**, v 46, p 321, 1991.

DEDEKE, G. A.; OWAGBORIAYE, F. O.; ADEBAMBO, A. O.; ADEMOLU, K. O. Earthworm metallothionein production as biomarker of heavy metal pollution in abattoir soil. **Applied Soil Ecology**, v. 104, p. 42–47, 2016.

EATON, W.; HOFRICHTER, J. Specific spectroscopic properties of hemoglobins **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 175-262, 1983.

FASMAN, G. D. *et al.* **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**, New York: Plenum Press, 1996. 739 p.

FIGUEIREDO, A. **Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do vírus da dengue**. 2013. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

FREIRE, E. Differential scanning calorimetry. In: **Protein stability and folding theory and practice**. Totowa: Humana Press, 1995. v. 40, p. 191-217. 1995.

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

HARNOIS, T.; ROUSSELOT, M.; ROGNIAUX, H.; ZAL, F. High-level Production of Recombinant Arenicola Marina Globin Chains in Escherichia Coli: A New Generation of Blood Substitute. **Artificial Cells Blood Substitutes and Immobilization Biotchnoplogy**. Vol. 37, No. 3, pp. 106-116 2009

HIRSCH, R. E.; JELICKS, L. A.; WITTENBERG, B. A.; KAUL, D. K.; SHEAR, H. L.; HARRINGTON, J. P. A first evaluation of the natural high molecular weight polymeric *Lumbricus terrestris* hemoglobin as an oxygen carrier. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v. 25, n. 5, p. 429–444, 1997.

KÄGI, J. H. R. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: SUZUKI, K. T.; IMURA, N.; KIMURA, I. (Eds). **Metallothionein III: biological roles and medical Implications**. Birkhauser Verlag Basel. 1993. P. 29 – 55.

KAO, W. Y.; QIN, J.; FUSHITANI, K.; SMITH, F. F.; GORR, T. A.; RIGGS, C. K.; KNAPP, J. E.; CHAIT, B. T.; RIGGS, A. F. Linker chains of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*: Primary structures of linkers L2, L3, and L4 and analysis of the connectivity of the disulfide bonds in linker L1. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 63, n. 1, p. 174–187, 2006.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biophysica et Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1338, n. 2, p. 161-185, 1997.

KINBERG, J. G. H. **Annulata nova**. Öfversigt af Konglelige Vetenskaps-Akademien's Förhandlingar v. 23 p. 337-357, 1867.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R., Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60 p. 702-706, 1983.

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

KRUEGER, V. **Eletroquímica para o ensino médio**. 1. Ed. Porto Alegre: Área de Educação Química do Instituto de Química da UFRGS. 66 p. 1997.

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

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, P. 341 – 379. 1983.

LVOV, Y.; ARIGA, K.; ICHINOSE, I.; KUNITAKE, T. 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.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007

MELO, A.S.Q. **Métodos analíticos para avaliação e controle de vanádio e cobre em água de mar e efluentes de refinaria de petróleo**. 2003. 176 p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

MERLIM, A. O.; GUERRA, J. G. M.; JUNQUEIRA, R. M.; AQUINO, A. M. Soil macrofauna in cover crops of figs grown under organic equilibria, **Scientia Agricola**, 62, 1: 57-61. 2005.

MOREIRA, L. M.; MORAES, P. C. G.; MENDONÇA, J. P. R. F. Hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*: um extraordinário sistema supramolecular hemoprotéico. **Química Nova**, Campinas, Vol. 34, No. 1, 119-130, 2011.

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

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. In: XLVI Annual Meeting of Brazilian Biochemistry Society. Águas de Lindóia. Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2017.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

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

PERUSSI, J R.; TABAK, M. Fluorescence study of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia** v.32, n.1 , p.239, mar. 1989.

POLI, A. L.; MOREIRA, L. M.; IMASATO, H. Autoxidation of giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Molecular mechanism and oligomeric implications. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 82, n. 1, p. 306–315, nov. 2011.

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

RAMOS, R. J.; ARRUDA, I.; ARRUDA, G.; VIEIRA, I. G.; VIEIRA, N. C. S.; TEREZO, N. C. S.; TEREZO, A. J.; GUIMARÃES, R. J. **Processo para a construção eletrodos modificados e sistema de medição do índice de concentração do pesticida metamidofós**. BR10201201819752012. 23 de Jul. de 2012. Categoria: Produto e Processo. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção.

REECE, J. B.; **Biologia de Campbell**. 8. Ed. (Português). Porto Alegre: Artmed, 2010. 1488 p.

RICARDO, J.; GESSER, J.C.; DOMINGOS, J.B.; Caracterização de polietilenoimina derivatizada com reagentes acetilante e metilante como modelo de enzima artificial (synzyme). In: Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu. 2009.

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

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

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

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

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

ROYER, W. E.; STRAND, K.; HEEL, M. V.; HENDRICKSON, W. A. Structural hierarchy in erythrocruciorin, the giant respiratory assemblage of annelids. **Biochemistry**, v. 97, n. 13, p. 7107–7111, 2000.

RÓZ, A. L. *et al.* **Nanoestruturas – Princípios e Aplicações**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, V. 1. 2015.

SANTIAGO, P. S. CARVALHO, F. A. O.; DOMINGUES, M. M.; CARVALHO, J. W. P.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Isoelectric point determination for *Glossoscolex paulistus* extracellular hemoglobin: oligomeric stability in acidic pH and relevance to protein-surfactant interactions. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9794-9801, 2010.

SANTIAGO, P. S. MOREIRA, L. M.; ALMEIDA, E. V. de; TABAK, M. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* Hemoglobin (HbGp) upon interaction with cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants: dissociation of oligomeric structure and autoxidation. **Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects**, v. 1770, n. 4, p. 506-517, 2007.

SANTIAGO, P. S. MOURA, F.; MOREIRA, L. M.; DOMINGUES, M. M.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Dynamic light scattering and optical absorption spectroscopy study of pH and temperature stabilities of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 6, p. 2228-2240, 2008.

SANTOS, M. C. **Preparação e caracterização elétrica de filmes ultrafinos de polianilina/poli (vinil sulfato de sódio) PANI/PVS**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

SCHIMITZ, K.S. **Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules**. 1 ed. Academic press. 472 p. 1990.

SHARMA, P. K.; KUCHUMOV, A. R.; CHOTTARD, G.; MARTIN, P.D.; WALL, J. S.; VINOGRADOV, S. N. The Role of the Dodecamer Subunit in the Dissociation and Reassembly of the Hexagonal Bilayer Structure of *Lumbricus terrestris* Hemoglobin. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 8754–8762, 1996.

SIQUEIRA JR., J.R. **Filmes automontados de quitosana/metaloftalocianinas: caracterização e aplicações em sensores**. 2006. 96 folhas. Dissertação (Mestrado). São Carlos, EESC/IFSC/IQSC-USP.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**, 5ª. ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.

STEFFEN, G. P. K.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, R.B.; JACQUES, R. S.J. Importância ecológica e ambiental das minhocas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 137–147, 2013.

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

TABAK, M. CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; BACHEGA, J. F. R.; SANTIAGO, P. S. Recent new characterizations on the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* and some other giant hemoglobins from different worms. In: INNOCENTI, A. (Ed.). **Stoichiometry and research: the importance of quantity in biomedicine**. Rijeka: InTech, 2012. Chap. 15, p. 337-356. 2012.

TAMÁS, M.; SHARMA, S.K.; IBSTEDT, S.; JACOBSON, T.; CHRISTEN, F. Heavy Metals and Metalloids As a Cause for Protein Misfolding and Aggregation. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 252–267, 2014.

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

VELLO, T. P.; OLIVEIRA, R. F.; SILVA, G. O.; CAMARGO, D. H. S.; BUFON, C. C. B. Simple capacitive method to evaluate ethanol fuel samples. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–7, 2017.

VINOGRADOV, S.N. The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocrucorins and chlorocrucorins). *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*. v. 82, p 1-15. 1985.

VITAGLIANO, L.; BONOMI, G.; RICCIO, A.; PRISCO, G.; SMULEVICH, G.; MAZZARELLA, L. The oxidation process of Antarctic fish hemoglobins. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 9, p. 1651–1659, 2004.

VOET, D; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

WANG, C.; ZOU, X.; WANG, Q.; SHI, K.; TAN, J.; ZHAO, X.; CHAI, Y.; YUAN, R. 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: Fundamentals and Applications**, 2a. ed., Wiley-VCH: New Jersey, 2000.

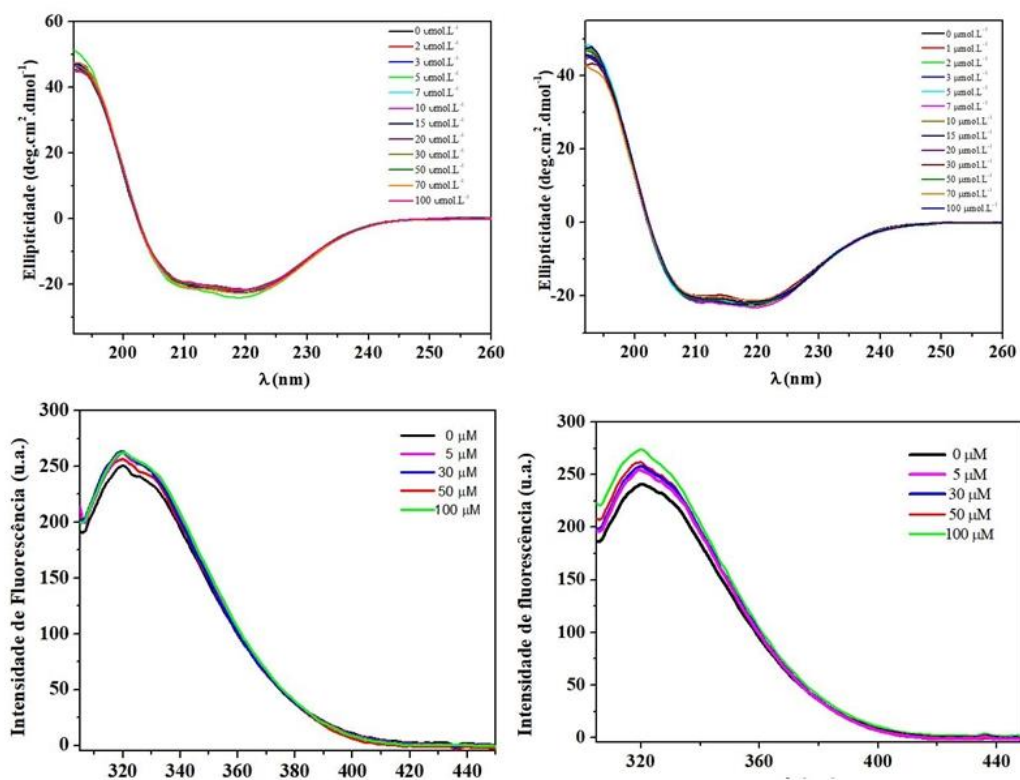
ZAL, F. GREEN, B.N; MARTINEAU, P; LALLIER, FH; TOULMOND, A; VINOGRADOV, S.N; CHILDRESS, J.J. Polypeptide chain composition diversity of hexagonal-bilayer haemoglobins within a single family of annelids, the Alvinellidae. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5227-5236, 2000.

ZAL, F.; ROUSSELOT, M. Extracellular Hemoglobins from Annelids, and their Potential Use in Biotechnology. In: **Outstanding Marine Molecules**. 1. ed. Weinheim:.. p. 511. 2014.

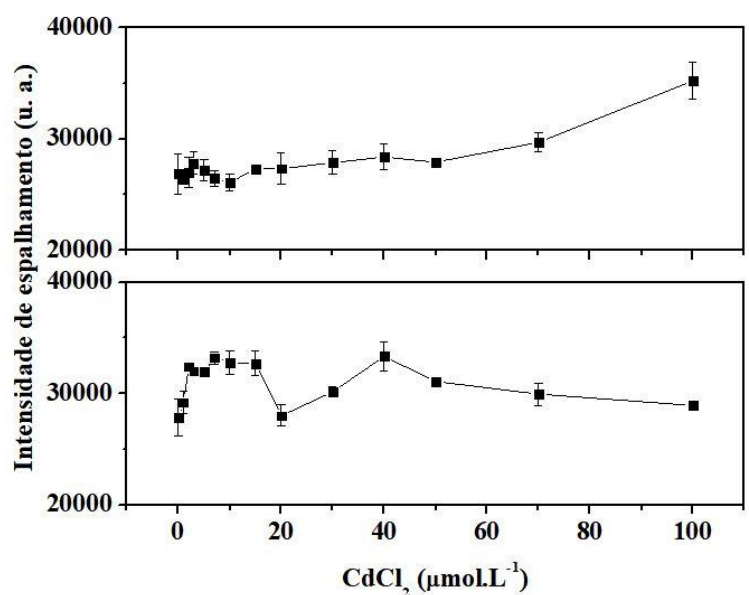
ZHU, H.; OWNBY, D. W.; RIGGS, C. K.; NOLASCO, N. J.; STOOPS, J. K.; RIGGS, A. F. Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*: roles of subunit equilibria, non-globin linker chains, and valence of the heme iron. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 30007-30021,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

APÊNDICE A

Figura A1. (A e B) Espectros de dicroísmo circular da HbAg na presença de cádmio ($0-100\mu\text{mol.L}^{-1}$) nos valores de pH de 5,0 e 7,0, respectivamente. (C e D) Apresentam os espectros de fluorescência para a HbAg em contato com o cádmio para os valores de pH 5,0 e 7,0, respectivamente.

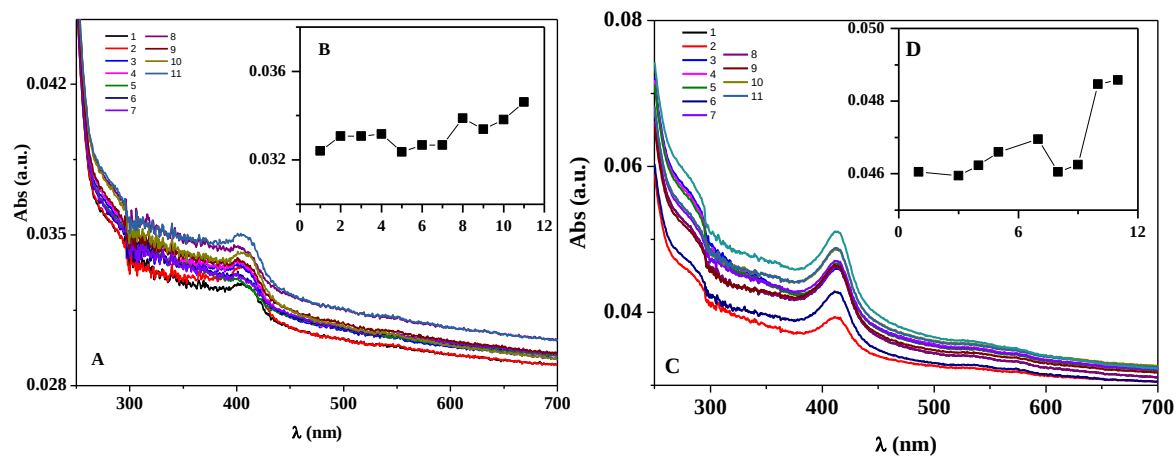


A2. Espalhamento de luz da HbAg na presença de cádmio ($0-100\mu\text{mol.L}^{-1}$) nos valores de pH de 5,0 e 7,0, respectivamente.



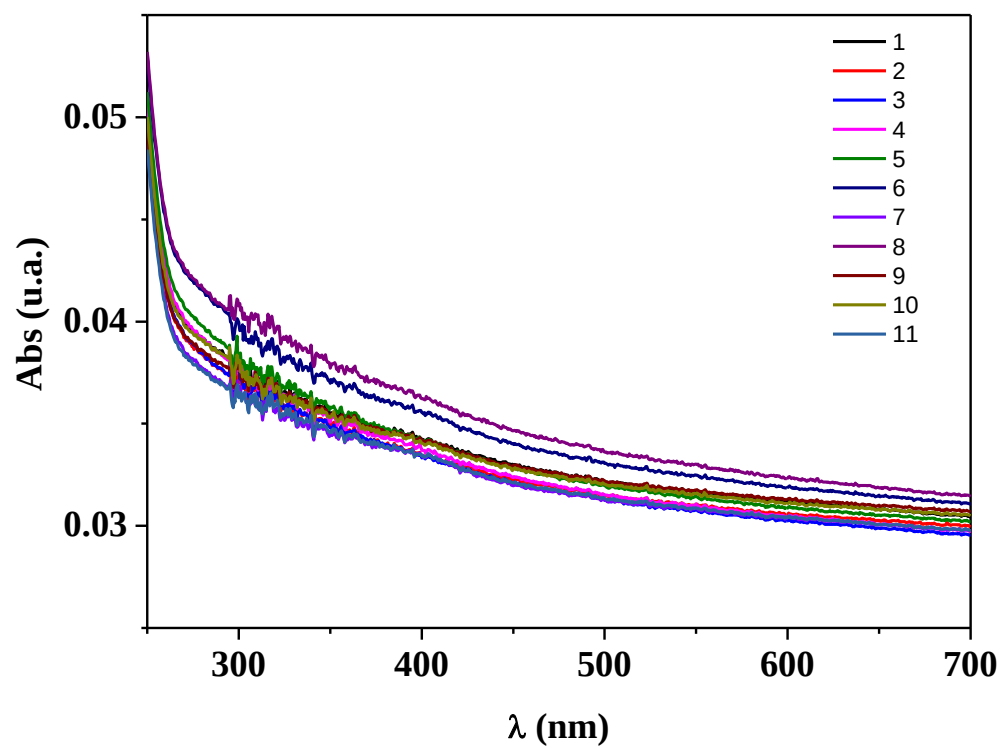
APENDICE B

Figura A2. Crescimento dos filmes PAH/HbAg em pH 5,0 (A) e pH 7,0 (C)



APÊNDICE C

Figura A3. Crescimento e interação PEI/HbAg pH 5,0 com dez camadas



APENDICE D

Figura A4. PEI/PVS: (A) Crescimento de 6 bicamadas (B) interação com cobre de 1 bicamada e (C) interação com cobre de 10 bicamadas.

