UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

LUIZ FILIPE TSARBOPOULOS DE RESENDE

Estudos conformacionais da proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) e sua interação com o polímero NAFION® em diferentes condições físico-químicas por espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência.

São Paulo

2019

LUIZ FILIPE TSARBOPOULOS DE RESENDE

Estudos conformacionais da proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) e sua interação com o polímero NAFION® em diferentes condições físico-químicas por espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência.

Dissertação apresentada a Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em 12 de abril de 2019. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de Concentração:

Ciências - Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador:

Profa. Dra. Patricia Targon Campana

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)

CRB-8 4936

Resende, Luiz Filipe Tsarbopoulos de
Estudos conformacionais da proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) e sua interação com o polímero NAFION® em diferentes condições físico-químicas por espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência / Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende ; orientadora, Patrícia Targon Campana - 2019
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo
Versão corrigida

1. Bioquímica. 2. Albuminas. 3. Polímeros. 4. Fluorescência.
I. Campana, Patrícia Targon, orient. II. Título

CDD 22.ed. – 572

RESENDE, Luiz Filipe Tsarbopoulos de

Estudos conformacionais da proteína Albumina do Soro Bovino (BSA) e sua interação com o polímero NAFION® em diferentes condições físico-químicas por espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência.

Dissertação apresentada a Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Área de Concentração:

Ciências - Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovado em: 12 / 04 / 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr.	Alexandre Marletta	Instituição:	INFIS-UFU
Julgamento:	Aprovado	Assinatura:	_____
Prof. Dr.	Roberto Kopke Salinas	Instituição:	IQ-USP
Julgamento:	Aprovado	Assinatura:	_____
Prof ^a . Dr ^a .	Silgia Aparecida da Costa	Instituição:	EACH-USP
Julgamento:	Aprovado	Assinatura:	_____

*Dedico este trabalho a todos aqueles que puderem fazer deste uma ferramenta de
aprendizado.*

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Patricia Targon Campana, por todo o tempo doado em minha trajetória acadêmica. Agradeço também pela atenção e disposição em me ensinar e apoiar.

Aos membros do Grupo de Pesquisa em Biomateriais e Espectroscopia (BMESpec), especificamente Thiago Reinaldos, Aline Orvalho e Isabella Italiano.

Ao corpo técnico dos laboratórios, Sandra Maria Helena Garcia Bittencourt, Clarino do Divino Vieira, Geison Castro da Silveira e Kelliton José Mendonça Francisco. Também aos meus colegas do CAT por todo auxílio e paciência, Camila Passos e Leonardo Pregolato.

Aos meus pais que me apoiaram psicologicamente e financeiramente.

À Allana Lins Amorim, minha amiga e companheira, que tem me apoiado nesta caminhada. Meus mais queridos amigos Renato Alves Resende, Bruna Tsarbopoulos, Ronan Souza e Amanda Rocha por toda ajuda, paciência, tempo e internet doados.

Gostaria também de agradecer aos Professores Felipe A. Chambergo, Viviane A. Nunes, José Ribamar dos Santos F. Júnior e demais professores do Laboratório de Biotecnologia, funcionários do setor de pós-graduação, funcionários da biblioteca junto a Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH) da Universidade de São Paulo (USP).

Finalmente a todos que tiveram participação de algum modo nesta caminhada, espero atender as expectativas e valer todo o investimento de tempo, cuidado e aprendizado por vocês doado.

“ A Dúvida é o Princípio da Sabedoria.”¹

¹Aristóteles (384 a.C. — Atenas, 322 a.C.).

RESUMO

RESENDE, Luiz Filipe Tsarbopoulos de. **Estudos conformacionais da proteína Albumina do Soro Bovino (BSA) e sua interação com o polímero NAFION® em diferentes condições físico-químicas por espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência.** 2019. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Versão corrigida

Estudos anteriores mostram que o polímero Nafion® pode causar deslocamento do equilíbrio conformacional de proteínas em valores de pH que não o fisiológico. Nesse sentido, o Nafion® não só pode ser utilizado como uma sonda interessante para estudos estruturais de proteínas, mas, também, é importante entender seu papel na conformação da proteína. Portanto, a Albumina do Soro Bovino (BSA) foi escolhida como modelo para o estudo dos efeitos do Nafion® na conformação helicoidal de proteínas. A finalidade deste trabalho é entender as alterações na conformação e vizinhanças aromáticas da BSA, na faixa de pH de 2 a 12, na presença e ausência de Nafion®, que pode também revelar o papel do polímero na exposição dos aromáticos e nos processos de transferência de energia. As alterações da estrutura secundária foram medidas por Dicroísmo Circular e os espectros de fluorescência no estado estacionário foram usados para analisar as mudanças nas vizinhanças dos aromáticos. Os resultados mostraram a diminuição discreta do conteúdo helicoidal da conformação da BSA na região extremamente básica, pH 11 em relação à conformação em pH 7. Já na região ácida, pH 2, embora haja considerável diminuição do conteúdo helicoidal, a BSA ainda mantém quase 50% de sua conformação secundária regular. Em relação aos ambientes dos aromáticos triptofano e tirosina, a eficiência quântica da emissão de fluorescência diminui em regiões ácidas e básicas, indicando que, nessas estruturas, os aromáticos encontram-se em restrição conformacional em relação ao observado na proteína nativa. Estes resultados apontam para a mudanças na conformação da BSA em ambas as regiões: ácidas e básicas, incluindo mudanças das estruturas secundárias e nas vizinhanças dos aromáticos. A adição do Nafion®, por outro lado, acentua o deslocamento para o azul e diminuição da exposição dos aminoácidos, tanto em solução quanto em estado sólido. A estrutura secundária da proteína é completamente modificada pelo polímero na região ácida, e esta conformação é mantida nas regiões neutra e básica, sugerindo que o Nafion® não estabiliza estruturas helicoidais.

Palavras-chave: Albumina do Soro Bovino (BSA). Nafion®. Dicroísmo Circular (CD). Fluorescência.

ABSTRACT

RESENDE, Luiz Filipe Tsarbopoulos de. **Bovine Serum Albumin (BSA) conformational studies and interaction with the NAFION® polymer under different physicochemical conditions by circular dichroism and fluorescence spectroscopy**. 2019. 63 f. Dissertation (Master in Science) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2019. Corrected version.

Previous studies have shown that Nafion® can disturb the conformational equilibrium of some proteins when at pH other than physiological ones. In this sense, Nafion® can be used to study protein conformation, but is also important to understand its interaction with the proteins. In this work, Bovine Serum Albumin (BSA) was chosen as a model to understand the modifications caused by Nafion® at helical proteins' conformation. More specifically, the aim encompasses the understanding of changes in BSA secondary conformation and aromatic vicinities, at pH range from 2 to 12, in the Nafion®'s presence and absence. Secondary changes were measured by Circular Dichroism and steady-state fluorescence was used to study the aromatic vicinities. Results have shown small differences at helix content in the extremely basic pH (pH 11) when compared to BSA conformation at pH 7 (native one). At pH 2, on the other hand, although a decreasing in helical content was observed, BSA was able to keep almost 50% of secondary regular conformation. Regarding the aromatic vicinities (tryptophans and tyrosines) the fluorescence emission quantum efficiency decreased in both regions (acid and basic), suggesting that the aromatics in these conformations are found in a more restricted environment. Nafion®, when added, promoted a decreasing in aromatic exposition, both in solution and solid state, while the secondary structure is completely modified by its presence in all pH range, suggesting that helical conformations are not stabilized by Nafion®.

Keywords: Bovine Serum Albumin. Nafion®. Circular Dichroism (CD). Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Transição HOMO-LUMO ($\pi \rightarrow \pi^*$)	17
Figura 2 – Diagrama de Perrin-Jablonski	19
Figura 3 – Espectro de dicroísmo circular de estruturas secundárias “puras”	22
Figura 4 – Proteína Albumina do Soro Bovino (BSA - PDB: 3v0)	23
Figura 5 – Polímero Nafion®	24
Figura 6 – Espectros de fluorescência de triptofanos da proteína BSA em tampão PBA em pH 12,0	32
Figura 7 – Espectro de fluorescência de triptofanos da proteína BSA em tampão PBA em pH 12,0	33
Figura 8 – Distribuição de picos de intensidade de fluorescência por espectroscopia de BSA em triplicatas	34
Figura 9 – Solubilização da proteína BSA com Nafion® em tampão PBA	35
Figura 10 – Conformação secundária da proteína BSA na ausência e presença de Nafion® em tampão PBA em pH ácidos	37
Figura 11 – Conformação secundária da proteína BSA na ausência e presença de Nafion® em tampão PBA em pH ácido-neutros	38
Figura 12 – Conformação secundária da proteína BSA na ausência e presença de Nafion® em tampão PBA em pH básicos	39
Figura 13 – Espectro de excitação de aminoácidos aromáticos (em 330 nm) da proteína BSA em tampão PBA	40
Figura 14 – Espectro de fluorescência de aminoácidos aromáticos (em 280 nm) da proteína BSA com e sem adição de NAFION® em tampão PBA.	43
Figura 15 – Rendimento quântico da BSA (em 280 nm)	45
Figura 16 – Rendimento quântico de Triptofano da proteína BSA em presença de Nafion® (em 280 nm)	46
Figura 17 – Amostras de BSA acrescidas de polímero Nafion®	47
Figura 18 – Conformação secundária da proteína BSA na presença de Nafion® em tampão PBA em estado sólido sob variação de pH.....	48
Figura 19 – Efeito do aumento de concentração de Nafion® sobre o espectro de Fluorescência da proteína BSA em 280 nm.....	49
Figura 20 – Substratos de estado sólido com amostras de proteína BSA com adição de Nafion®	50
Figura 21 – Espectro de fluorescência de aminoácidos aromáticos (em 280 nm) da proteína BSA com adição de Nafion® em estado sólido de tampão PBA	51
Figura 22 – Espectro de fluorescência de aminoácidos aromáticos (em 295 nm) da proteína BSA com adição de Nafion® em estado sólido de tampão PBA	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Proteína BSA	Proteína Albumina de Soro Bovino
CD	Dicroísmo Circular
FFT	Transformada de Fourier (<i>Fast Fourier Transform</i>)
FAD	Flavina-Adenina Dinucleótido
GOx	Enzima Glicose Oxidase
HOMO	Mais alto orbital molecular ocupado do estado fundamental (<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
LUMO	Mais baixo orbital desocupado do estado excitado (<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
PBA	Tampão Fosfato/Borato/Acetato de sódio (<i>phosphate-borate-acetate buffer</i>)
PI	Ponto isoelétrico
PL	Fotoluminescência de Emissão (<i>Photoluminescence emission</i>)
PLE	Fotoluminescência de Excitação (<i>Photoluminescence excitation</i>)
PHE	Aminoácido aromático Fenilalanina
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (<i>Small-angle X-ray scattering</i>)
TRP	Aminoácido aromático Triptofano
TYR	Aminoácido aromático Tirosina
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	O PROBLEMA DO ENOVELAMENTO E O DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS..	14
1.2	ESTUDOS CONFORMACIONAIS DE PROTEÍNAS.....	15
1.2.1	ABSORÇÃO E LEI DE <i>BEER-LAMBERT-BOUGUER</i>	16
1.2.2	FOTOLUMINESCÊNCIA E AS VIZINHANÇAS DOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS.....	17
1.2.3	EFICIÊNCIA QUÂNTICA	19
1.2.4	DICROÍSMO CIRCULAR E CONFORMAÇÃO SECUNDÁRIA	20
1.3	PROTEÍNA ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA)	24
1.4	NAFION®	23
1.5	HIPÓTESE	25
2	OBJETIVOS.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	MATERIAIS.....	27
3.2	PREPARO DE AMOSTRAS.....	27
3.3	ESPECTROSCOPIA.....	27
3.3.1	ABSORÇÃO.....	27
3.3.2	ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA	28
3.3.3	ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR.....	29
3.5	ANÁLISE DAS CURVAS FLUORESCÊNCIA.....	29
3.5.1	NORMALIZAÇÃO E EFICIÊNCIA QUÂNTICA.....	29
3.6	ESTATÍSTICA E A NORMALIZAÇÃO DOS DADOS	30
4	RESULTADOS	32
4.1	ANÁLISE DAS AMOSTRAS EM TRIPLICATAS	32
4.2	ABSORÇÃO DA BSA.....	34
4.3	CONFORMAÇÃO DA BSA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO POLÍMERO NAFION®	35
4.4	CONFORMAÇÃO SECUNDÁRIA DA BSA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE NAFION®	36
4.5	FLUORESCÊNCIA E VIZINHANÇA DOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EM SOLUÇÃO.	38
4.5.1	RENDIMENTO QUÂNTICO	43
4.6	ESTUDOS DA CONFORMAÇÃO DA PROTEÍNA BSA EM ESTADO SÓLIDO: PREPARAÇÃO DOS FILMES	45
4.7	CONFORMAÇÃO SECUNDÁRIA DA BSA EM ESTADO SÓLIDO	46
4.8	FLUORESCÊNCIA E VIZINHANÇA DOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EM ESTADO	

	SÓLIDO	46
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO.....	57
7	CONTINUIDADE DESTE TRABALHO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	ANEXO A - MATERIAL SUPLEMENTAR.....	62
	ANEXO B - FIGURAS SUPLEMENTARES.....	63

1 INTRODUÇÃO

As moléculas são constituídas de matéria e energia provenientes da ligação entre átomos. No caso das proteínas, especificamente, essa organização dos diferentes átomos e suas respectivas energias resulta em diferentes estruturas no espaço, permitindo que as proteínas desempenhem papéis cruciais em todos processos de aparecimento e manutenção à vida, tais como catálise enzimática, geração e transmissão de impulsos nervosos, proteção imune e controle do crescimento e da diferenciação celular. A distribuição espacial dos átomos de dada proteína é chamada de estrutura. Essa estrutura específica, também chamada enovelamento, sendo definida pela distribuição espacial de menor energia, favorável e a única na qual a proteína realiza sua função no ponto máximo de eficiência. Em virtude da importância biológica, quando mal enoveladas, as proteínas encontram-se envolvidas em significantes disfunções e doenças, tais como: Alzheimer e Parkinson. Haja vista a relevância da estrutura, se faz indispensável a elucidação das relações entre a estrutura molecular e a função das biomoléculas, sobretudo das proteínas, bem como a compreensão dos mecanismos moleculares que possam interferir na atividade proteica em função da interação com seus ligantes específicos em membranas celulares. Esta organização das estruturas secundárias ou enovelamento de menor energia, pode também ser definida como conformação, sendo esse estado dinâmico. De modo que o chamado equilíbrio conformacional, se refere ao estado conformacional sob a influência das interações intramolecular e intermoleculares, dependentes do ambiente físico-químico em que se encontra.

Embora este vasto campo de pesquisa venha sendo explorado há décadas, tal discussão permanece em vanguarda, uma vez que a compreensão das relações entre a estrutura e a função destas moléculas é um passo fundamental no desenvolvimento de biomateriais como *scaffolds* biofuncionalizados, sistemas de liberação de drogas e outras aplicações desta área contemporânea.

Pesquisas envolvendo modificações estruturais tanto em proteínas quanto em outras biomoléculas com aplicação biotecnológica, provocadas por agentes externos, como variações de pH e/ou temperatura (Campana *et al.*, 2011), agentes desnaturantes e caotrópicos, variações de pressão (Royer, 1990; Foguel e Weber, 1995). Ainda, a interação de biomoléculas com materiais poliméricos (Mecheri *et al.*, 2012; Mecheri *et al.*, 2015), requerem a utilização de uma série de métodos físicos, químicos e bioquímicos, desde

clonagem e expressão da sequência proteica, isolamento e síntese de pequenas biomoléculas (tais como isoflavonas, flavonóides e terpenos); passando pela utilização de métodos cromatográficos de separação e solubilização do material biológico. Sendo esta solubilização um desafio quanto a manutenção do equilíbrio conformacional em diferentes solventes aquosos e tampões devidas as variações de força iônica. Finalmente, os métodos espectroscópicos, dentre os quais destacam-se as espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência, além da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS). Mais recentemente, a atividade óptica Raman, tem sido utilizada alternativamente no estudo conformacional de pequenas moléculas (Basilio *et al.* 2016) e enovelamento secundário e supra-secundário de proteínas. Tais metodologias permitem a caracterização de mudanças estruturais nos estudos de interações de biomoléculas com polímeros, ou a partir de mudanças no ambiente, bem como a determinação de parâmetros termodinâmicos das biomoléculas em estudo.

1.1 O problema do enovelamento e o desenvolvimento de biomateriais

Vários destes desafios científicos encontram-se presentes nos documentos que representam os tópicos de pesquisa prioritários em Ciência e Tecnologia para o Brasil, Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação 2012-2015 e Plano Brasil 2022 da Secretaria de Assuntos Estratégicos (SAE), Ministérios e da Casa Civil. Dos tópicos presentes nestes documentos, destacam-se a Biotecnologia e Desenvolvimento de Biomateriais, que estão também em acordo com o maior programa em Pesquisa e Inovação Europeu, o HORIZON 2020 - *The EU Framework Programme for Research and Innovation*, indicando que o estudo de proteínas continua sendo relevante para que possamos resolver os problemas de fronteira atuais e futuros.

As proteínas também têm sido moléculas-chave no desenvolvimento de biomateriais, como tecidos biomiméticos - *scaffolds*- funcionalizados, biosensores, células a combustível enzimáticas - *biofuel cells* - (empregadas na área de energias renováveis) e sistemas para liberação de drogas. Além de sua aplicação intrínseca devido às funções biológicas que elas desempenham, atualmente as proteínas lançaram um novo desafio à ciência chamada Nanomedicina devido à formação da, ainda muito pouco conhecida, coroa de proteína (*protein corona*) (Cedervall *et al.*, 2007;; Lynch *et al.*, 2007; Casals *et al.*, 2010), em torno, principalmente, de nanopartículas através da adsorção de proteínas oriundas da circulação sanguínea ou mesmo dos tecidos, onde as nanopartículas são implantadas. Esta coroa de

proteínas adsorvidas pode causar tanto a instabilidade na solução coloidal de nanopartículas através de processos como floculação ou precipitação, quanto agregação ou formação de fibras das próprias proteínas adsorvidas provocando uma resposta do organismo às nanopartículas que pode comprometer sua interação com os receptores diminuindo sua eficácia ou, ainda, torná-las imunogênicas. Em todos esses processos, é fundamental que sejam compreendidos os mecanismos de estabilização e modificação conformacional das proteínas envolvidas, bem como sua interação com polímeros, sais e outras moléculas presentes no processamento dos biomateriais. Este entendimento é essencial uma vez que a estrutura tridimensional incorreta pode, também, interferir na função biológica das proteínas, e, portanto, atenuando ou até mesmo anulando, a eficiência do dispositivo produzido.

1.2 Estudos conformacionais de proteínas

As técnicas empregadas no estudo conformacional de proteínas, tais como as espectroscopias (quadro 1), permitem medidas qualitativas e quantitativas da interação da radiação eletromagnética com a matéria. O espectro resultante é uma razão entre a energia emitida ou absorvida e a energia incidente, reflexo de sua estrutura espacial. O quadro 1 resume as técnicas experimentais utilizadas na observação de mudanças conformacionais e estruturais em proteínas. Os eventos físicos envolvidos em cada uma das técnicas são descritos a seguir.

Quadro 1 – Técnicas experimentais de estudos conformacionais de proteínas.

Técnica	Parâmetro estrutural estudado
Absorção	
Absorbância UV-Vis	Fornece informações sobre a estrutura e determinação da concentração de proteína pura e complexada, pela absorção dos aminoácidos aromáticos (cromóforos) e ligações peptídicas (observação dos eventos de transição eletrônica do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$).
Dicroísmo Circular eletrônico (CD, <i>Circular Dichroism</i>)	
180 – 250 nm (UV distante) Contribuição dominante: amidas e pontes dissulfeto.	Estrutura secundária e presença de pontes dissulfeto. A desconvolução dos espectros pode fornecer informações quantitativas.
250 – 400 nm (UV próximo) Contribuição dominante: aminoácidos aromáticos.	Modificações nas vizinhanças de aminoácidos aromáticos podendo fornecer informações sobre a conformação terciária e/ou ligação de ligantes.

Fotoluminescência	
250 - 400 nm (UV próximo) PL (Emissão): Fluorescência do fluoróforo intrínseco.	As alterações do espectro de emissão e no rendimento quântico estão relacionadas às mudanças no ambiente físico-químico dos aminoácidos aromáticos, podendo refletir mudanças conformacionais terciárias na proteína, e/ou interações com ligantes.
250 - 400 nm (UV próximo) PLE (Excitação): Excitação de Fluorescência do fluoróforo intrínseco.	Permite localizar o máximo de emissão dos aminoácidos aromáticos. Bem como a evolução dos máximos no intervalo observado.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Após mais de um século de estudos e teorias sobre a absorção, um dos fenômenos base da interação de luz com a matéria, em 1947, foi produzido o primeiro espectrofotômetro de absorção na região UV-visível, que combinava parâmetros para medição daquilo que era chamado de “além do violeta”. A ideia passa pelo conceito de Gustav Kirchhoff, que em 1859, apresentou a teoria de que se uma substância tinha uma emissão particularmente boa em determinado comprimento de onda, então esta teria de mesmo modo uma boa absorção naquele mesmo comprimento de onda. Apropriando-se deste conceito, alguns pesquisadores se empenharam em separar os comprimentos de onda com um prisma e observaram que o comprimento de onda de excitação e emissão/absorção tinham um certo deslocamento (Thomas, 1991).

1.2.1 Absorção e lei de *Beer-Lambert-Bouguer*

A absorção quanto fenômeno físico relacionado a determinação conformacional de biomoléculas tem dois valiosos usos elementares. Sendo o primeiro: fornecer informações sobre a estrutura de uma molécula quando complexadas ou ligadas com outras moléculas (ligantes), que podem influenciar na quantidade de energia absorvida. Além disso, a absorção pode ainda corroborar para quantificação e padronização das moléculas em estudo, uma vez que ϵ está diretamente relacionado à concentração molar.

O fenômeno de absorção é relativo a diferença de energia (ΔE) entre a luz incidente (I_0) e a luz transmitida (I_T) em um comprimento de onda específico (λ) ou intervalo de observação. Ao incidir na amostra, a luz é absorvida provocando a transição eletrônica, do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Fisicamente, este evento corresponde à transição de um elétron de um orbital molecular fundamental ou não excitado, que no caso do benzeno e seus derivados, ocorre do orbital HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*, para o chamado LUMO (*Lowest*

Unoccupied Molecular Orbital), um orbital molecular excitado livre de menor energia ou acceptor (Figura 1).

A medida resulta em uma curva que representa a absorção (ou a transmitância, seu inverso) em função do comprimento de onda (eixo x). A intensidade (eixo y , no gráfico) está relacionada ao coeficiente de extinção molar da molécula, ou do composto, sendo a posição do máximo de absorção (λ_{max}) correspondente ao comprimento de onda de radiação com a maior probabilidade de que a transição eletrônica ocorra.

O fenômeno de absorção é descrito pela função a seguir:

$$\text{Log} \frac{I_T}{I_0} = -A(\lambda) \quad (1),$$

onde I_T é a intensidade transmitida, I_0 a intensidade inicial (excitação) e $A(\lambda)$ a absorção de luz em determinado comprimento de onda específico.

Figura 1 – Transição HOMO-LUMO ($\pi \rightarrow \pi^*$). A absorção é a diferença de energia (ΔE) proveniente da transição eletrônica do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, que ocorre com a excitação de um elétron de uma orbital molecular excitada fundamental (HOMO) para uma camada excitada desocupada (LUMO).

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

A concentração de moléculas em solução pode ser observada segundo a Lei de *Beer-Lambert-Bouguer* (equação 2), desde que a absorção A aumente gradualmente, acompanhada

pelo aumento da concentração até o ponto limítrofe. Este ponto é chamado o limite de linearidade e representa o limite de concentração para a qual a lei de Lambert-Beer é válida. Logo, para soluções concentradas (superiores ao limite), deixa de existir proporcionalidade linear entre a concentração e a absorbância. A Lei de *Beer-Lambert-Bouguer* é expressa pela equação a seguir:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (2),$$

onde A é a absorbância de luz, ε é o coeficiente de absortividade molar ($\text{mol/L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) específico da molécula, C é a concentração molar (mol/L) e l o caminho óptico (cm), ou seja, o caminho que a luz percorre na amostra. Esta lei, empírica, é derivada da seguinte forma:

$$I_T = I_0 \times 10^{-A(\lambda)} \quad (3).$$

Imediatamente após a absorção de um fóton, vários processos ocorrerão com probabilidades variadas, entre eles, relaxação vibracional, fluorescência e fosforescência, explicitados a seguir.

1.2.2 Fotoluminescência e as vizinhanças dos aminoácidos aromáticos

Dentre as metodologias mais utilizadas na caracterização estrutural, bem como na determinação de parâmetros termodinâmicos de proteínas, tem-se a espectroscopia de fluorescência que é parte dos fenômenos de fotoluminescência. Essa técnica baseia-se na propriedade que algumas moléculas (cromóforos) possuem de emitir luz como resultado de absorção oriunda de outras fontes, a excitação. Essa emissão de radiação eletromagnética é devida as transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estados de menor energia. Mais especificamente, a luz é emitida quando o estado excitado singlete (S_1) decai para o estado singlete fundamental (S_0) (Cantor e Schimmel, 1980) como representado na Figura 2.

Figura 2 – Diagrama de Perrin-Jablonski. Quando uma molécula luminescente absorve um fóton, é excitada do seu estado fundamental (S_0) para algum nível de vibração superior do primeiro ou segundo estado eletrônico (S_1 ou S_2). Essa transição ocorre em cerca de 15 segundos e os prováveis processos de desativação podem ser observados no diagrama.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Imediatamente após a absorção de um fóton, vários processos ocorrerão com probabilidades variadas, mas o mais provável será o relaxamento vibracional, que é a perda de energia na ausência de emissão de luz, com um tempo geralmente menor que um picossegundo. Quando há este decaimento para o nível mais baixo de energia vibracional do primeiro estado excitado (S_1) o excesso de energia vibracional é convertido em calor, que é absorvido por moléculas vizinhas ao colidir com o fluoróforo no estado excitado (Herman *et al.*, 1999; Lakowicz *et al.*, 2011).

Uma molécula excitada existe no menor estado excitado singlete S_1 por períodos na ordem de picossegundos (o período de tempo mais longo no processo de fluorescência) antes de finalmente relaxar para o estado fundamental. Se o relaxação deste estado é acompanhado pela emissão de um fóton, o processo é formalmente conhecido como fluorescência (Herman *et al.*, 1999; Lakowicz *et al.*, 2011).

As proteínas, em sua maioria, contêm pelo menos um dos três resíduos que possuem esta propriedade: tirosina, fenilalanina e triptofano. A fluorescência desses resíduos é altamente específica e sensível ao ambiente em que se encontram, sendo o triptofano o mais utilizado devido a seu alto rendimento quântico e coeficiente de extinção em comparação aos demais (Pierce e Boxer, 1995). Deste modo, tanto as pequenas mudanças conformacionais, quanto às alterações no enovelamento envolvendo esses fluoróforos ou suas vizinhanças, alteram a intensidade do espectro, máximo de emissão da fluorescência e o rendimento quântico. Essas alterações também podem suprimir a fluorescência, indicando interações com ligantes ou supressores naturais e alterações estruturais de proteínas. Bem como, podem ainda ocorrer eventos de fosforescência. Este evento tem reemissão mais lenta e de menor energia, quando comparada à fluorescência. A fosforescência pelo decaimento de estado de energia que passa pela conversão de um orbital singleto (S) para um orbital tripleto (T), é uma transição considerada proibida pela quântica, ou seja, de probabilidade quase nula, justamente associada a diferença de geometria entre os orbitais (Figura 2).

As transições eletrônicas de uma molécula ocorrem na região do ultravioleta (400 - 10 nm) e visível (800 - 400 nm). O domínio do espectro ultravioleta utilizável em análises de espectroscopia é entre aproximadamente 190 a 400 nm, sendo a soma do chamado UV-próximo (400 nm - 200 nm) e UV-distante (200 nm - 10 nm). Já o domínio do espectro visível se espera aproximadamente entre 400 e 800 nm.

1.2.3 Eficiência Quântica

A eficiência ou rendimento quântica é relativa à capacidade inerente a molécula de absorção e emissão de fótons. Assim sendo, nada mais é que a razão entre a quantidade de fótons emitidos pela quantidade de fótons absorvidos de uma dada molécula. Esta eficiência é a capacidade desta molécula em emitir fótons quando decai de um estado excitado para um estado fundamental. Em razão da co-existência de populações com diferentes estados conformacionais em um mesmo ambiente físico-químico, a eficiência quântica reflete a somatória das probabilidades do evento de decaimento de um estado excitado das populações com a emissão de fótons. Isto se deve ao fato da observação completa do espectro e não apenas do ponto de máximo em um determinado comprimento de onda específico (λ).

1.2.4 Dicroísmo Circular e conformação secundária

O dicroísmo circular (CD – *Circular Dichroism*) (Woody *et al.*, 1994) é observado quando uma molécula opticamente ativa apresenta diferenças entre a absorção de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica em que a capacidade das moléculas em desviar a luz polarizada é medida em uma faixa de comprimentos de onda. Esta técnica consiste na observação do desvio de luz polarizada à direita e à esquerda, por isso, é amplamente utilizada para estudar moléculas quirais de todos os tipos e tamanhos. Todavia, pode-se dizer que é no estudo de moléculas biológicas, onde se encontram suas aplicações mais importantes. Um uso primário é análise da estrutura secundária ou a conformação de macromoléculas, particularmente as proteínas, uma vez que a estrutura secundária é sensível ao seu ambiente, temperatura ou pH. O dicroísmo circular pode ser usado para observar como a estrutura secundária muda de acordo com as condições ambientais ou pela interação com outras moléculas. As informações estruturais, cinéticas e termodinâmicas sobre macromoléculas podem ser derivadas da espectroscopia de dicroísmo circular. Para tanto, este cromóforo deve ser assimétrico. No caso das proteínas e peptídeos, estes cromóforos estão, principalmente, em ligações peptídicas, cadeias laterais dos aminoácidos, e grupos prostéticos, todos com absorção na região ultravioleta.

O espectro de CD entre 180 e 260 nm, região ultravioleta distante, pode identificar diferentes tipos de estrutura secundária, como hélices-alfa, folhas-beta pregueada ou fita beta, tanto paralela quanto antiparalela, voltas-beta e estruturas randômicas (Figura 3). Já entre 260 e 350 nm, região ultravioleta próximo do visível, são observadas as cadeias laterais aromáticas (fenilalanina, triptofano e tirosina) e as ligações dissulfeto que contribuem predominantemente na formação do espectro. Apesar dos sinais nesta região serem pouco intensos quando comparados à região do ultravioleta distante do visível, há uma grande vantagem em explorá-la, pois podem ser identificadas mudanças ao redor dos aminoácidos aromáticos. Nos casos em que estes aminoácidos encontram-se em sítios ativos, interações entre proteínas ou peptídeos e seus ligantes podem ser estudadas. Além disso, os espectros na região ultravioleta próximo podem identificar rearranjos na estrutura terciária, como por exemplo, reorientação de hélices que não podem ser observadas na região distante e muitas vezes são confundidas com diminuição no conteúdo de estrutura secundária (Woody e Dunker, 1996).

Figura 3 – Espectro de dicroísmo circular de estruturas secundárias “puras”. Representação das estruturas secundárias fundamentais em dicroísmo circular de proteínas.

Fonte: Adaptado de Brahms & Brahms, 1980..

1.3 Proteína Albumina de Soro Bovino (BSA)

As albuminas são uma grande família de proteínas, servindo como proteína transporte, na forma da proteína solúvel mais abundante no plasma de mamíferos (Majolek *et al.*, 2012; Malarkani *et al.*, 2017). Devida a sua importância e abundante disponibilidade, as albuminas de soro são amplamente estudadas. Dentre as proteínas desta família, a albumina de soro bovino (BSA – *PDB: 3v03*) é considerada uma proteína modelo e tal como outras proteínas da mesma família, apresenta uma estrutura majoritariamente hélice regular, organizada em formato de coração (Figura 4). Isto é, devida à sua estrutura, já resolvida, e conhecimento da sua estrutura e função, esta proteína tem sido empregada em diversos estudos biológicos e físico-químicos para a compreensão de um determinado fenômeno biológico e de mudanças na estrutura e função. A BSA é uma proteína composta de 583 aminoácidos, sendo 20 tirosinas e 2 triptofanos por monômero, Trp-134 e Trp-213 (Malarkani *et al.*, 2017), estruturada majoritariamente em hélice (cerca de 73% - 431 resíduos) e organizada em formato de coração (*heart shape*).

A BSA é produzida no fígado e, presente no soro, constitui cerca de 60% do plasma sanguíneo (Alvarez *et al.*, 1996). A priori, a função *in vivo* da BSA é de regulação da pressão

osmótica do sangue. Sendo esta solúvel em água, sua principal função é de transportar moléculas insolúveis, como lipídeos, cálcio (Ca^{2+}) e outros íons. Esta função se deve a afinidade entre BSA e os ácidos carboxílicos de cadeia longa que permite carregar moléculas hidrofóbicas com baixa solubilidade aquosa. Estas moléculas se ligam a bolsas hidrofóbicas localizadas na estrutura da proteína. Um exemplo é a ligação do ácido carboxílico à albumina, no sistema de transporte lipídico de mamíferos, onde estes ácidos graxos, insolúveis, podem circular no plasma (Pedraz *et al.*, 2012). Em razão desta propriedade que permite a ligação entre a albumina e os ácidos graxos, diversos estudos utilizam sua capacidade de ligação aos adsorventes específicos como facilitador na purificação de moléculas com fins terapêuticos (Alvarez *et al.*, 1996).

Figura 4 – Proteína Albumina do Soro Bovino (BSA - PDB: 3v03). Proteína organizada majoritariamente em hélices (em vermelho), em formato de coração representada em dímero. Em evidência a região contendo os aminoácidos aromáticos (em azul o triptofano – TRP e em amarelo o aminoácido tirosina – Tyr).

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019. Imagem gerada em RASMOL (*student license*).

1.4 NAFION®

O polímero Nafion® representado na Figura 5, tem sido empregado como membrana de troca catiônica em biossensores, nos quais os elétrons mediadores da troca se encontram

entre o sítio ativo da proteína e o transdutor. Dentre as proteínas mais usadas para este tipo de biossensor está a enzima Glicose Oxidase (GOx), devido a sua alta especificidade, custo relativamente baixo e confiabilidade (Bankar *et al.*, 2009). Embora a GOx seja muito utilizada, os bioeletrodos resultantes apresentam sensibilidade relativamente baixa, a depender da aplicação desejada. Entretanto, biossensores usando esta enzima e diferentes combinações de moléculas, tais como as β -ciclodextrinas e o ferroceno (Yumei *et al.*, 2009); ferroceno (Chinnadaiyala *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2015) e óxido de zinco (Zhao *et al.*, 2013), têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar esta sensibilidade. Embora alguns trabalhos tenham mostrado resultados positivos neste sentido, é importante observar que a interação entre as proteínas (piruvato oxidase, álcool oxidase e uricase no caso dos trabalhos acima) e o Nafion® não foi investigada. De fato, poucos trabalhos têm sido feitos no sentido de entender a natureza das interações entre o polímero e as proteínas, tão pouco, as mudanças provocadas em sua conformação ou em seu sítio ativo.

Figura 5 – Polímero Nafion®. Nafion® é uma membrana de troca iônica perfluorada que possui uma ampla variedade de usos comerciais. A forma ácida (íon hidrogênio) e seus derivados são sólidos, catalisadores superácidos e úteis em uma ampla variedade de aplicações sintéticas. (Descrição original do fabricante traduzida)

Fonte: SIGMA-ALDRICH/MERCK

(Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/274674?lang=pt®ion=BR>. Acesso em: 09 de janeiro de 2019).

Neste sentido, nosso grupo mostrou que a adição de Nafion® para imobilização da GOx em eletrodo de carbono parece aumentar o conteúdo de estrutura regular da proteína quando comparado à sua estrutura sem adição polímero em tampão Fosfato-Borato-Acetato, todos sais de sódio (PBA) em condições fisiológicas. Este aumento na estrutura regular pode ter comprometido a atividade biológica da enzima pela restrição do espaço conformacional e diminuição das possibilidades de ligação com a membrana, de forma que aumentar a barreira energética para a ativação da enzima, podendo ser esta uma explicação para a observada diminuição da atividade catalítica da proteína imobilizada em relação à proteína livre

(Mecheri *et al.*, 2013). Este estudo foi estendido (Mecheri *et al.*, 2015) para a investigação dos efeitos do Nafion® na estabilidade conformacional da proteína GOx em diferentes ambientes físico-químicos, utilizando a espectroscopia de Dicroísmo Circular (*Circular Dichroism*, CD) para verificar a ocorrência de mudanças estruturais secundárias, e a espectroscopia de fluorescência no estado estacionário para verificar mudanças nas vizinhanças dos triptofanos e do cofator dinucleótido de flavina e adenina (FAD) e, conseqüentemente, no sítio ativo da proteína. Além disso, a atividade catalítica da enzima foi investigada através de técnicas eletroquímicas. Com relação às mudanças na conformação da enzima, os resultados preliminares revelaram que a adição do Nafion® parece deslocar todas as formas da GOx em direção às formas com maior conteúdo de estruturas regulares em todas as regiões de pH estudadas: ácida, neutra e básica. Apesar dos resultados sugerirem uma espécie de “efeito de ordenação” provocado pelo Nafion® na estrutura secundária da GOx, a interação entre grupos específicos na proteína e no polímero ainda não foi bem compreendida, tampouco a importância dos íons ou da própria água do tampão no sistema Nafion®/proteína. Ademais, as interações devem depender do tipo de enovelamento da proteína estudada.

1.5 Hipótese

Ciente dos diferentes usos do polímero Nafion®, sua vasta aplicabilidade em biomateriais e com base nos estudos anteriores de nosso grupo quanto as modificações físico-estruturais da GOx e a interação com o polímero, justifica-se uma investigação profunda das mudanças conformacionais causadas. Como observado nesta proteína, que apresenta tanto estruturas do tipo beta quanto hélices alfa, o polímero favorece estruturação em hélices, aumentando o percentual dessas estruturas regulares. De modo que com base nos trabalhos anteriores, onde há interação entre o polímero e a proteína BSA e justificada a importância da compreensão do comportamento de Nafion® em interação com proteínas, a hipótese é do favorecimento das estruturas tipo helicoidais pela ação do polímero sobre a proteína composta apenas por estruturas secundárias do tipo hélice.

2 OBJETIVOS

Propõe-se aqui estudar as mudanças conformacionais provocadas pela ação do polímero Nafion® na proteína modelo Albumina de Soro Bovino (*Bovine serum albumin* - BSA), pelas espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência. Mais especificamente, as conformações da proteína BSA foram analisadas tanto na ausência quanto na presença do polímero Nafion® em diferentes vizinhanças físico-químicas (variação de pH entre 2,0 e 12,0), em solução e em estado sólido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Foram utilizados: Albumina de Soro Bovino (BSA, **B691** SIGMA-ALDRICH/MERCK, DE - CAS 9048-46-8), acetato de sódio, borato de sódio, fosfato de sódio e o polímero Nafion® (Nafion 117, espessura 0,007. **274674** SIGMA-ALDRICH/MERCK, DE – CAS 31175-20-9). Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água Milli-Q ultrapura, bem como todos os reagentes de grade espectroscópica/analítica.

3.2 Preparo de amostras

As soluções estoque de BSA foram preparadas em água Milli-Q com concentração final de 200 mg/mL de proteína. A partir desta solução, foram preparadas as amostras, em Tampão 20 mM de fosfato de sódio, borato de sódio, acetato de sódio (PBA), com variação de pH entre 2,0 e 12,0. A concentração final de proteína variou entre 1,2 e 1,8 mg/mL para experimentos de fluorescência (em solução) e entre 1,2 e 1,6 mg/mL para experimentos de dicroísmo circular, com base nos trabalhos com a Glicose Oxidase (Mecheri *et al.*, 2012; Mecheri *et al.*, 2015).

As amostras em estado sólido necessitam de maior concentração de proteína, em razão do caminho óptico percorrido durante a obtenção do espectro, que é de 10 mm, para as amostras em solução e caminho óptico de aproximadamente 1 mm em substrato de quartzo. Por este motivo estas amostras foram concentradas 10 vezes. De modo que, essa maior concentração na amostra durante a secagem, permite uma concentração equivalente de fluoróforos no filme (com relação à solução). A partir desta concentração de proteína BSA, foram feitos filmes em substrato, provenientes do depósito de uma gota com cerca de 70 µL, com tempo de secagem de 210 minutos em dissecador de vidro com bomba de vácuo PM13224-810 de 60 Hz (EDWARDS, Burgess Hill, UK) e uso de sílica de secagem.

Para experimentos com polímero Nafion®, as amostras contendo o tampão PBA e proteína foram acrescidas de 20 µL de Nafion.

3.3 Espectroscopia

3.3.1 Absorção

Para a absorção foi utilizado protocolo de λ único de ponto máximo de absorção em 280 nm. A análise correta da densidade óptica (D.O.) ou número de cromóforos, que reflete diretamente a concentração de proteína, só pode ser obtida através desta medida, e não por medidas indiretas, como *Bradford*. Além disso, a primeira parte dos experimentos foi realizada em triplicata.

As amostras foram preparadas com volume final de 1 mL, adicionando-se 500 μ L de tampão PBA (20 mM), 490 μ L de água Milli-Q e 10 μ L de proteína BSA (diluída em água), finalizadas com concentração de sais no tampão de 10 mM. Foi adotado um valor aproximado de densidade óptica para os preparos individuais das amostras, mantendo a variação da densidade óptica, dentro de um intervalo estabelecido de $1,0 \pm 0,2$ (D.O.). Para fins de compreensão quantitativa, o valor estimado de proteína em mg/mL variou entre 1,2 e 1,8 mg/mL (Tabela 1 do Material Suplementar – Anexo A).

Para o segundo grupo de amostras, foram preparados também 1 mL de cada amostra (pH), também em tampão PBA 20 mM (não diluído), onde foram adicionados 12 μ L da solução estoque da proteína BSA para uma otimização D.O. entre 0,8 e $1,0 \pm 0,2$. Para amostras de BSA com Nafion®, foram adicionados 12 μ L de proteína em 988 μ L de tampão (para cada pH). Já as amostras contendo o polímero, foram adicionados os mesmos 12 μ L de BSA em 968 μ L de tampão PBA (20 mM) e acrescidos de 20 μ L de polímero Nafion®, adicionado posteriormente. As densidades ópticas obtidas são mostradas na Tabela 2 do Material Suplementar – Anexo A).

3.3.2 Espectros de fluorescência

Os espectros de fluorescência dos triptofanos e tirosinas da proteína BSA foram obtidos no espectrofluorímetro ISS PC1 (ISS, Illinois, USA), em solução, utilizando-se cubetas de quartzo retangulares com caminho óptico de 1 cm. As fendas utilizadas foram de 2 mm no canal de excitação e variaram de 0,5 a 1 mm para o canal de emissão. As medidas foram realizadas em temperatura constante a 35°C, controlada por banho circulante. A fim de minimizar os efeitos de espalhamento, foi utilizado um filtro de 305 nm no canal da emissão para obtenção dos espectros de excitação, além da subtração dos espectros de tampão e tampão/Nafion®. Para a análise de emissão, as amostras foram excitadas em 280 nm (Triptofano e Tirosina) e 295 nm (somente triptofanos). Já para os espectros de excitação de fotoluminescência, foram centrados os máximos de emissão em 330 e 340 nm e medidos os intervalos de excitação de 230-300 nm e 230-310 nm respectivamente.

A obtenção dos espectros de Fluorescência em estado sólido foi, também, realizada em equipamento ISS PC1 (ISS, Illinois, USA), utilizando-se filmes feitos em substrato de quartzo, acoplados ao adaptador metálico de 45° de angulação, projetado para o equipamento. Os demais parâmetros na obtenção dos espectros de excitação e emissão de fluorescência se mantêm da etapa de obtenção dos espectros em solução.

3.3.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros CD foram obtidos no espectropolarímetro Jasco modelo J815 (Jasco Inc., Japão), utilizando cubetas de quartzo, com 1 mm de caminho óptico, no intervalo de 190 a 250 nm para UV-distante, a 25 °C. Todos os espectros foram gravados após 4 acumulações, com subtração dos espectros de referência (tampão e tampão com Nafion) e seu ruído foi eliminado através da aplicação de filtros FFT (*Fast Fourier Transform*).

3.5 Análise das curvas fluorescência

As curvas foram ajustadas por gaussianas utilizando-se o *software* OriginLab® (OriginLab, Northampton, MA, Origin 2018 – *Academic*- licença fornecida pela USP). Além disso, as curvas foram normalizadas considerando como 1 a amostra de maior concentração.

3.5.1 Normalização de resultados e Eficiência Quântica

Assim como no caso do ajuste das curvas, estas análises também foram feitas a partir do *software* Origin®. A normalização foi feita em etapas distintas, sendo a primeira normalização a retirada da contribuição do tampão no espectro. Esta etapa permite uma leitura mais clara dos dados, retirando assim possíveis ruídos do tampão, mas também o fundo de lâmpada.

Em seguida, foi feita a segunda normalização do conjuntos de dados (Tabela suplementar 1 – Anexo A), referente aos valores relativos obtidos em triplicata de amostras de BSA em tampão PBA 20 mM. Com base nos espectros, foram comparadas as amostras das triplicadas em cada ambiente físico-químico (Δ pH), afim de conhecer o comportamento e variação da vizinhança aromática dos aminoácidos aromáticos Tirosina (Tyr) e Triptofano (Trp).

Obtidos os espectros de fluorescência dos tipos PLE e PL (obtenção dos máximos de excitação e de emissão, respectivamente), é possível calcular o chamado rendimento quântico

da proteína sob variação de condição físico-química. Esta medida da exposição dos aminoácidos aromáticos, ou eficiência quântica, é uma razão entre a Potência absorvida (P_{Abs}) e a área relativa ao espectro de emissão (PL). Assim sendo, esta potência segue a seguinte igualdade (Sampaio, Não publicado) na equação 4, abaixo:

$$P_{Abs} = I_0 - I_T = I_{Abs} \quad (4)$$

Segundo a Lei de *Beer-Lambert-Bougar*, descrita anteriormente, sabendo que a absorção é uma igualdade de $\log I_0/I_T$ - razão entre a intensidade inicial de luz ou excitação, e a intensidade final (Total), ou emissão -, para o caso de proteínas em solução, pode-se inverter o sinal da igualdade, como mostrado nas equações (5 e 6):

$$\log \frac{I_T}{I_0} = -Abs(\lambda), \quad (5)$$

$$I_T = I_0 \times 10^{-Abs(\lambda)}, \quad (6)$$

Deste modo, substituindo I_T na equação (4), obtém-se a equação (7), a expressão da potência absorvida. Onde $Abs(\lambda)$ é o valor de densidade óptica dos cromóforos (resíduos aromáticos triptofano e tirosina) em um ponto único (*single-point*, λ) :

$$P_{Abs} = I_0(1 - 10^{-Abs(\lambda)}), \quad (7)$$

Estes valores de λ foram obtidos como descrito anteriormente e estão contidos na Tabela 1 do Material Suplementar (Anexo A). Estas potências são calculadas no OriginLab, bem como a Área da PL, calculada pela integral dos picos dos espectros para cada pH (já normalizado) e deste resultado é feita a razão: Área da PL/ P_{Abs} , chamada de eficiência quântica.

3.6 Estatística e a normalização dos dados

A análise estatística realizada foi do tipo Kruskal-Wallis para medidas independentes. Esta medida se baseia na ordenação dos dados e, não apenas, na variação e média, o que permite avaliar diferenças entre grupos de amostras ou tratamentos independentes. A ordenação das amostras atribui um valor t , que representa a posição da amostra x em uma fila

contínua de ordenação para as amostras de todos os grupos. Para o cálculo do H estatístico utiliza-se a equação 8:

$$H = \left(\frac{n+1}{N(N+1)} \right) * \left(\sum \frac{R^2}{n} \right) - 3(N+1), \quad (8)$$

onde n é o valor do número de amostras em um grupo individual, N é o número total de amostras dos diferentes grupos e R é a posição ou *ranking* das amostras ordenadas para cada grupo. Tomando por base um valor de graus de liberdade, $\alpha=0,05$ e calculado H , é feito o cálculo do p -value para a significância da diferença entre as amostras dos grupos, o qual um valor de p superior a 0,05 indica que não há uma diferença significativa entre os grupos amostrais.

4 RESULTADOS

4.1 Análise das amostras em triplicatas

A fim de validar a metodologia escolhida, propõe-se dois pontos principais. O primeiro é que, do ponto de vista espectroscópico, a obtenção de triplicatas de espectros de fluorescência é insignificante. O segundo ponto, que valida a presente metodologia, é a própria análise estatística, do tipo Kruskal-Wallis, para medidas independentes.

Inicialmente, os experimentos de estudos conformacionais de espectroscopia de fluorescência foram feitos em triplicatas controladas de forma independente. Como pode-se observar o espectro de fluorescência das diferentes triplicatas se mantém muito semelhante comparado um conjunto com e sem triplicatas das amostras (Figura 6A e 6B). Para tanto foram utilizados os espectros das diferentes amostras em cada um dos pH, que foram posteriormente integrados e normalizados, apresentando um resultado de perfil tal qual os espectros obtidos pelas triplicatas individuais (Figura 6B).

Figura 6 – Espectros de fluorescência de triptofanos da proteína BSA em tampão PBA em pH 12,0. (A) Espectros de fluorescência obtidos pela técnica de espectroscopia. (B) Espectros de fluorescência por espectroscopia e curva integrada e normalizada resultante dos dados.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

A Figura 6A mostra o espectro de emissão de fluorescência da BSA em pH 12. É possível notar que as três amostras (A, B e C) possuem um máximo de emissão em torno de 340 nm com intensidade próxima de 75. O espectro normalizado dos anteriores (Figura 6B) também possui a mesma forma de linha. A variação que se mantém em, aproximadamente $\pm$

3.5, na intensidade do máximo de emissão (Figura 7), provavelmente reflete uma pequena variação de intensidade entre as amostras, que pode ser causada por uma diferença de excitação ou concentração de proteína. Entretanto o comprimento de onda dos máximos se mantém na mesma região, indicando que as populações ou vizinhanças aromáticas são idênticas entre as amostras.

Figura 7 – Espectro de fluorescência de triptofanos da proteína BSA em tampão PBA em pH 12,0.
Variação dos dados de fluorescência normalizados obtidos pela técnica de espectroscopia.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Também, do ponto de vista estatístico, se observada a distribuição dos picos de intensidade de fluorescência das diferentes amostras, temos uma distribuição muito semelhante, observada pelo mesmo formato da curva de distribuição dos dados (Figura 8A). O que se pode, de mesmo modo observar, é uma distribuição com alto grau de correlação entre as amostras (Figura 8B). Mesmo que observada maior disparidade entre a amostra A e as amostras B e C, existe uma forte correlação entre a triplicata. Esta forte correlação é evidenciada quando aplicado o método Kruskal-Wallis (para cada conjunto), o H estatístico calculado é 2,6104 (2, $N = 498$), com p -valor de 0,27112 para uma diferença significativa

quando p é inferior a 0,05, logo sendo a diferença entre os três grupos de amostras insignificante, aceita a hipótese de H_0 , onde os grupos amostrais são estatisticamente iguais.

Figura 8 – Distribuição de picos de intensidade de fluorescência de triplicatas de BSA por espectroscopia. (A) Distribuição dos picos por intensidade de fluorescência em cada amostra com preparo independente. (B) Correlação entre picos de intensidade de fluorescência das amostras da triplicata.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Em razão da similaridade dos resultados obtidos nos espectros de emissão de BSA, e da validação estatística do método, optou-se pela utilização de amostras de um grupo único para comparação entre os grupos de amostras com BSA sem e com adição do polímero Nafion®, em solução e estado sólido.

4.2 Absorção da BSA

Fez-se possível a obtenção dos valores de absorção referentes à proteína BSA utilizando-se um ponto único de comprimento de onda (λ) da curva relativo ao máximo de absorção em 280 nm. Os valores de absorção foram mantidos entre 0,8 e 1,0 para os grupos

tratamentos, com variação de $\pm 0,2$. Os resultados completos de densidade óptica são mostrados nas Tabela 1 e 2 dos materiais suplementares (Anexo A).

4.3 Conformação da BSA na presença e ausência do polímero Nafion®

É importante ressaltar que em pH ácido, tipicamente entre os pH 2,0 e 4,0, as amostras contendo Nafion, principalmente em concentrações mais baixas de tampão, tem precipitação da solução. De mesmo modo, na faixa de pH básicos, entre os pH 8,0 e 12,0, observou-se que polimerização do composto. Esta precipitação torna-se mais rápida quando concentrações de 50 e 100 mM de tampão PBA foram empregadas e atenuada com uso de 20 mM de tampão PBA.

Figura 9 – Solubilização da proteína BSA com Nafion® em tampão PBA. (A) Amostras contendo proteína BSA e Nafion® incubado por 12 horas nos pH extremos ácido (pH 2,0) e básico (pH 12,0). (B) Amostra de BSA e Nafion® incubado por 12 horas em pH 12,0 com agregação do composto.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Pode-se notar que existe um comportamento diferente das amostras contendo o polímero e em relação a BSA sem aditivo. O que se observa é que a estabilidade das amostras tende a mudar nos extremos da faixa de variação de valores de pH. A Figura 9 mostra a conformação dessas amostras nos extremos ácido (pH 2,0) e básico (pH 12,0). Em valores de pH ácidos (entre pH 2,0 e 4,0), ocorre a precipitação da solução, que se inicia logo após a adição do polímero. Já em valores de pH básicos, a amostra ganha coloração turva e ocorre a

polimerização ou agregação de Nafion®, como pode ser observado na Figura 9B (em pH 12,0, básico). Esta precipitação começa ocorrer logo que adicionado o polímero, enquanto a precipitação em valores de pH básicos ocorre com um período de incubação mínimo de 2 horas.

4.4 Conformação secundária da BSA na ausência e presença de Nafion

A conformação secundária da proteína BSA foi estudada por Dicroísmo Circular, na ausência e presença do polímero Nafion® e na faixa de pH de 2 a 12. Os espectros foram agrupados em três regiões: extremo ácido (de pH 2,0 a 4,0); neutro-ácido (de pH 5,0 a pH 6,0); fisiológico (pH 7,0); neutro-básico (de pH 8,0 a pH 9,0) e básico (de pH 10,0 a pH 12,0). As Figuras a seguir, mostram os espectros na região extremo ácido na ausência (A) e presença (B) do Nafion.

O espectro da BSA em pH 7,0 (curva tracejada) na ausência de polímero (Figura 10A) mostra um máximo positivo em torno de 198 nm e dois mínimos negativos em 209 e 225 nm, caracterizando a presença de estruturas helicoidais regulares. No caso da BSA, estas estruturas são provavelmente compostas por hélices-alfa. Já em pH 4,0, se nota ainda certa similaridade tipológica à hélices, entretanto já não se nota o primeiro mínimo negativo em 209 nm. Na região extremo ácida, o formato da curva se mantém, esta mudança pode ser observada pela diminuição gradativa do máximo e dos mínimos que tendem à conservação em pH 2,0 e 3,0, quando se acentua a mudança na forma das curvas, indicando provável diminuição no conteúdo helicoidal regular.

Figura 10 – Conformação secundária da proteína BSA na ausência e presença de Nafion® em tampão PBA em valores de pH ácidos. (A) Conformação de proteína BSA sem Nafion®. (B) Conformação de BSA com adição Nafion® incubado. As amostras são apresentadas: pH 2,0 em preto, pH 3,0 em vermelho, pH 4,0 em azul e pH fisiológico (7,0) tracejado.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

A adição de Nafion® (Figura 10B), provoca mudança significativa na estrutura secundária em pH 7,0, mostrando perturbação no equilíbrio conformacional da BSA e, portanto, das formas helicoidais. Em pH 4,0, assim como no pH fisiológico, observa-se a mudança da forma da curva, acompanhada pela diminuição do primeiro mínimo negativo (relativo às transições $n-\pi^*$), o que mostra que, embora a proteína apresente estrutura secundária regular (não estando, portanto, desnaturada), essa é diferente da estrutura nativa. Esse mínimo desaparece também, nos pH 2,0 e 3,0, que corroboram para a importância do polímero na perda parcial da característica secundária desta proteína.

Diferentemente do que ocorre em valores de pH ácidos, na região dos valores de pH ácido-neutros, mostrado na Figura 11A, a proteína parece sofrer apenas uma sutil modificação estrutural, que pode ser observada pelo decréscimo do máximo positivo em 198 nm, mas também alteração dos mínimos negativos em 209 e 225 nm. Apesar desta alteração, a proteína mantém estrutura muito semelhante à nativa.

Figura 11 – Conformação secundária da proteína BSA na ausência e presença de Nafion® em tampão PBA em valores de pH ácido-neutros. (A) Conformação de proteína BSA sem Nafion®. (B) Conformação de BSA com adição Nafion®. As amostras são apresentadas: pH 5,0 em vermelho, pH 6,0 em azul e pH fisiológico (7,0) tracejado.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

A Figura 11B mostra que assim como ocorre em pH ácido, nos valores de pH ácido-neutros, o equilíbrio conformacional da proteína é perturbado com a adição do polímero. Ocorre uma provável perda da característica helicoidal (regular) de BSA, que pode ser notada pela falta do ponto de mínimo em torno de 209 nm, que não é tão somente deslocado, mas deixa de aparecer. Nota-se também progressão gradativa do deslocamento observado em pH 4,0 (Figura 10B), comparado ao pH 6,0 (Figura 11B).

A proteína se mostra bem resistente as variações de pH, como podemos observar na Figura 12A. Nota-se que assim como observado no pH fisiológico (7,0) e valores de pH ácido-neutros, na faixa básica, que se divide em: neutro-básico (de pH 8,0 a pH 9,0); e extremo básico (de pH 10,0 a pH 12,0), ocorre a manutenção da conformação secundária. Esta conformação secundária, que se caracteriza pelo máximo positivo em 198 nm e dois mínimos em 209 e 225 nm, sugere a presença predominante de formas helicoidais regulares. De forma gradativa ocorre uma mudança do mínimo negativo em 209 nm, que somente em pH 12,0 não pode ser mais identificado. A conformação em pH 12,0, indica ainda que a proteína apresenta estrutura regular, mas diferente da estrutura nativa. Isto é evidenciado pela atenuação da primeira banda de mínimo negativo em torno de 209 nm.

Figura 12 – Conformação secundária da proteína BSA na ausência e presença de Nafion® em tampão PBA em valores de pH básicos. (A) Conformação de proteína BSA sem Nafion®. (B) Conformação de BSA com adição Nafion® incubado. As amostras são apresentadas: pH 12,0 em púrpura, pH 11,0 em azul escuro, pH 10,0 em azul, pH 9,0 em vermelho, pH 8,0 em laranja e pH fisiológico (7,0) tracejado.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

O polímero por sua vez altera a estrutura secundária (figura 12B), tal como ocorre nas outras faixas de pH. Sobressalta-se aqui que Nafion® não intensifica a perda estrutural em pH 12,0, que se mantém muito semelhante aos demais valores de pH do grupo, diferente do que ocorre sem adição do polímero.

4.5 Fluorescência e vizinhança dos aminoácidos aromáticos em solução

Quanto a excitação de fluorescência, tem-se os picos máximos em torno de 330 nm, no intervalo de 330 a 340 nm, onde ocorre a saturação de excitação, o que indica uma queda da eficiência quântica da excitação (Vo-Dinh, 2017). Ainda, quanto aos espectros de excitação, é possível também identificar o ponto de excitação que resulta no valor máximo de emissão no comprimento de onda determinado. Os resultados são agrupados nas seguintes regiões: extremo ácido (de pH 2,0 a 4,0); neutro-ácido (de pH 5,0 a pH 6,0); neutro (pH 7,0); neutro-básico (de pH 8,0 a pH 9,0) e básico (de pH 10,0 a pH 12,0). Estes são também subclassificados comparativamente entre a proteína BSA sem e com adição de Nafion®.

Figura 13 – Espectro de excitação de aminoácidos aromáticos (em 330 nm) da proteína BSA com e sem adição de Nafion® em tampão PBA. (A) Proteína BSA sem NAFION®, (B) Proteína BSA com adição de NAFION®. Dados de fluorescência normalizados, obtidos pela técnica de espectroscopia sob variação de pH. Os diferentes valores de pH foram distribuídos em regiões: extremo ácido (de pH 2,0 - vermelho); ácido-neutro (de pH 5,0 - laranja); neutro (pH 7,0 - azul); neutro-básico (pH 9,0 – verde oliva); e básico (pH 12,0 - magenta).

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

A Figura 13A mostra a evolução dos máximos de emissão em 330 nm para cada pH pela varredura da excitação (de 230 nm a 310 nm para proteína e, até 300 nm, para amostras contendo o polímero, em razão do alto espalhamento). Pode-se observar que a maior emissão ocorre quando a proteína é excitada próximo de 280 nm - comprimento de onda de excitação que corresponde à máxima absorção dos triptofanos, e inclui também a absorção das tirosinas da proteína – com uma variação de 3 nm para as amostras de proteína pura, no intervalo de 280 a 283 nm. Já para as amostras contendo o polímero, a variação é de 4 nm, onde seu intervalo compreende os comprimentos de onda entre 282 nm e 286 nm (Figura 13B). Também se observa que nos valores de pH extremos, ou seja, aqueles distantes do fisiológico, os máximos de excitação são deslocados na direção do visível.

A excitação dos aminoácidos aromáticos, na borda no intervalo de emissão, em 340 nm, onde ocorre a saturação da excitação, que provoca um salto na intensidade de excitação, relativo à lâmpada (Vo-Dinh, 2017), se apresenta muito semelhante ao que se observa em 330 nm, isto é, o comportamento das amostras nos tampões dos diferentes intervalos de pH pode ser considerado o mesmo. Como pode-se observar na Tabela 1 (Figura Suplementar 1A – Anexo B), a proteína tem excitação máxima no mesmo intervalo até 283 nm (fisiológico) e uma tendência ao UV-distante nos valores de pH neutro-ácidos e ácidos. Também é importante notar que este pendor se repete nos valores de pH do extremo básico (pH 11,0 e 12,0), entretanto o pH 12,0 tem um deslocamento ainda mais acentuado, onde seu máximo

ocorre em a excitação em 279 nm. Ademais, quando comparados os espectros de excitação da proteína com adição do polímero em 330 e 340 nm, observa-se que são de mesmo modo muito semelhantes, apresentando picos máximos de excitação no intervalo entre 282 e 286 nm. Da mesma maneira que ocorre com a proteína na ausência de polímero, existe um deslocamento do máximo referente ao pH 12,0, que diferentemente do que se dá no caso anterior (330 nm) apresenta seu pico máximo em 283 nm (Tabela 1 e Figura Suplementar 1B).

Tabela 1 – Valores de máximos de excitação e emissão de fluorescência de proteína BSA em diferentes valores de pH variando de 2,0 a 12,0.

	Valores de máximo de fluorescência							
	Fluorescência de Excitação				Fluorescência de Emissão			
	Excitação a 330 nm		Excitação a 340 nm		Emissão a 280 nm		Emissão a 295 nm	
	BSA	BSA + Nafion	BSA	BSA + Nafion	BSA	BSA + Nafion	BSA	BSA + Nafion
pH 2,0	280 nm	284 nm	281 nm	283 nm	329 nm	326 nm	329 nm	320 nm
pH 3,0	282 nm	285 nm	281 nm	286 nm	329 nm	317 nm	329 nm	320 nm
pH 4,0	281 nm	286 nm	282 nm	286 nm	332 nm	326 nm	335 nm	327nm
pH 5,0 (>PI)	282 nm	286 nm	282 nm	285 nm	340 nm	333 nm	342 nm	337 nm
pH 6,0	281 nm	284 nm	282 nm	284nm	341 nm	332 nm	342 nm	336 nm
pH 7,0	283 nm	284 nm	283 nm	283 nm	339 nm	333 nm	341 nm	334 nm
pH 8,0	282 nm	283 nm	282 nm	282 nm	339 nm	331 nm	340 nm	332 nm
pH 9,0	281 nm	284 nm	282 nm	283 nm	337 nm	326 nm	338 nm	327 nm
pH 10,0	283 nm	284 nm	283 nm	283 nm	337 nm	329 nm	339 nm	328 nm
pH 11,0	280 nm	283nm	281 nm	284 nm	336 nm	327 nm	337 nm	333 nm
pH 12,0	280 nm	285 nm	279 nm	283 nm	336 nm	329 nm	335 nm	320 nm

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Já quanto aos espectros de fotoluminescência de emissão (fluorescência), a maior eficiência de excitação para ambos aminoácidos aromáticos (tirosina e triptofano), ocorre em 280 nm. Já no comprimento de onda de 295 nm, tem-se a excitação de triptofano sozinho. Os resultados também são agrupados nas mesmas regiões e amostras: BSA sem o polímero e BSA com adição de Nafion®.

Os espectros de emissão de fluorescência de BSA sob variação do pH (regiões: extremo ácido; ácido; neutro; neutro-básico; e básico) é mostrado na Tabela 1 e Figura 14A, com máximo de excitação em 280 nm. Em pH 7,0 nota-se que os aminoácidos aromáticos (trp e tyr) encontram-se parcialmente expostos ao solvente (emissão máxima em 339 nm), nos demais valores de pH, a variação dos picos máximos de emissão começa em 329 nm e se estende até 341 nm. Pode-se observar que na região extremo-ácido o máximo tende a ocorrer

em comprimentos de onda mais distantes (329-332 nm), enquanto já na região netro-ácido se aproximam do fisiológico (340 e 341 nm). Ainda quanto as amostras na faixa de pH netro-básico, existe a manutenção do máximo de emissão no pH 8,0 em 339 nm e observa-se um distanciamento no pH 9,0, com máximo em 337 nm. Este comportamento se repete para os valores de pH básicos, com variação entre 337 nm (pH 10,0) e 336 nm (para pH 11,0 e 12,0). Visto este comportamento, pode-se afirmar que tanto nos extremos ácido quanto básico os aminoácidos estão menos acessíveis em relação ao observado em pH fisiológico e próximo ao *pI* da proteína.

Diferentemente do que se observa na proteína GOx, a adição do polímero as amostras de BSA, causa um deslocamento em direção ao UV-distante (chamado de “*blue shift*”) no espectro de emissão dos aminoácidos tirosina e triptofano (280 nm). Este comportamento é evidenciado pela observação da variação de picos máximos de emissão, que se estende de 317 a 333 nm, ou seja, existe um deslocamento em direção ao azul, que é característico de aminoácidos “escondidos” do solvente (com pouca acessibilidade a ele) (Figura 14B). Além do deslocamento causado pela variação do ambiente físico-químico, o deslocamento da emissão de BSA pela adição de Nafion® em pH fisiológico é de 6 nm (comparado ao pico máximo observado na condição sem polímero, em 339 nm).

Figura 14 – Espectro de fluorescência de aminoácidos aromáticos (em 280 nm) da proteína BSA com e sem adição de NAFION® em tampão PBA. (A) Proteína BSA sem NAFION®. (B) Proteína BSA com adição de NAFION®. Dados de fluorescência normalizados, obtidos pela técnica de espectroscopia sob variação de pH. Os diferentes valores de pH foram distribuídos em regiões: extremo ácido (de pH 2,0 - vermelho); ácido-neutro (de pH 5,0 - laranja); neutro (pH 7,0 - azul); neutro-básico (pH 9,0 – verde oliva); e básico (pH 12,0 - magenta).

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Pode-se observar na Tabela 1, a excitação dos triptofanos em 295 nm (Figura Suplementar 2A), que em pH 7,0, os 4 triptofanos encontram-se parcialmente expostos, como pode-se notar pelo pico máximo em 341 nm. A conformação da proteína, como revela o deslocamento referente aos valores de pH na região neutro-ácida, em 342 nm, com maior exposição dos triptofanos. Este estado demonstra uma alta sensibilidade aos valores de pH ácidos, sendo deslocado para 335 nm em pH 4,0 e, posteriormente, uma queda abrupta nos valores de pH 2,0 e 3,0, onde os máximos se encontram em 329 nm, ou seja, uma conformação onde os triptofanos estão encobertos, ou seja, se encontram menos exposto ao solvente. Esta conformação com os triptofanos menos disponíveis também se repete nos valores de pH da faixa neutro-básica e básica, onde ocorre um deslocamento em direção ao azul, quase gradual. O deslocamento se inicia no pH neutro-ácido 8,0 em 340 nm; e se estende até o pH 12,0, em 335 nm.

A adição do polímero, mostrado na Tabela 1 e Figura Suplementar 2B, desloca consideravelmente os picos máximos da proteína. O máximo do triptofano em pH 7,0, que sem adição d polímero se encontra em 341 nm, agora pode ser observado em 334 nm, ou seja, existe um deslocamento que sugere uma menor exposição dos triptofanos. Apenas os picos máximos dos valores de pH netro-básicos se mostram mais parecidos com a proteína pura (336 e 337 nm no pI). Esse deslocamento é interessante em valores de pH ácidos, cujos

máximos se mantêm em 327 para pH 4,0 e no limite de leitura (320 nm), para valores de pH extremos ácidos, pH 2,0 e 3,0. Também em pH neutro-básico (8,0), pode-se observar que o máximo está mais distante do visível, em 332 nm. Outra coisa que se pode notar é a distorção dos espectros que já não mais apresentam curvas bem definidas, o que podem causar o aparecimento de dois ou mais picos de máximos. Estes máximos podem ser chamados de máximos locais ou de região. Esta tendência se repete em pH 8,0 e se estende até pH 11,0. Neste último o espectro não é tão somente ruidoso, mas também tem perda de resolução, comportamento este que se observa também em pH 12,0, do qual não se pode ver um perfil de onda, mas sim uma reta de queda de intensidade de fluorescência.

Este comportamento sugere que a BSA tenha um equilíbrio conformacional pH-dependente, sobretudo quando distante da “faixa ótima” (entre o ponto isoelétrico e pH fisiológico), que é evidenciado na presença do polímero Nafion®. Entretanto, os espectros de fluorescência não indicam mudanças na estrutura secundária, comportamento este que foi observado com dicroísmo circular.

4.5.1 Rendimento quântico

Para o cálculo do rendimento quântico dos triptofanos e das tirosinas da BSA foram utilizados os valores dos máximos de absorção em 280 nm nos diferentes valores de pH. A figura a seguir (Figura 15) mostra o rendimento quântico nos diferentes valores de pH, agrupados nas seguintes regiões: extremo ácido (de pH 2,0 a 4,0); neutro-ácido (de pH 5,0 a pH 6,0); neutro (pH 7,0); neutro-básico (de pH 8,0 a pH 9,0) e básico (de pH 10,0 a pH 12,0).

Em pH 7,0 (fisiológico) o rendimento quântico da proteína foi de 100%. É possível observar que este rendimento quântico se mantém na região ácido-neutro, diminuindo em 30% e 50% na região extremo ácido. Já na região neutro básica, o rendimento decai 20% em relação à região fisiológica. Este decaimento segue de forma aproximadamente continua em direção ao pH básico, atingindo o rendimento mínimo de 14% em pH 12,0.

De modo similar, foi calculado o rendimento quântico para as amostras contendo o polímero Nafion® (Figura 16), também utilizando os valores dos máximos de absorção em 280 nm, e nas mesmas regiões.

Do mesmo modo que o da proteína pura, o rendimento quântico da proteína com adição de Nafion®, foi também normalizado para 100% em pH 7,0 (fisiológico). Este

rendimento máximo, que se mantém em pH 5,0, entretanto não se mantém para o pH 6,0, que tem uma diminuição de cerca de 25%. Já a região extremo ácido há uma diminuição em 37% e 50%. Na região neutro básica, o rendimento decai entre 34% e 62% em relação à região fisiológica. Este decaimento ocorre também a nível do grupo de pH básico, com a manutenção do rendimento quântico em pH 10 e decaimento de cerca de 70% em pH 11,0 que se mantém para o pH 12,0.

Figura 15 – Rendimento quântico da BSA (em 280 nm). Nas regiões: extremo ácido (de pH 2,0 a pH 4,0); ácido-neutro (de pH 5,0 a pH 6,0); neutro (pH 7,0); neutro-básico (de pH 8,0 a pH 9,0); e básico (de pH 10,0 a pH 12,0).

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Em razão destes resultados de rendimento quântico relativo, mostrados nas Figuras 15 e 16, mais especificamente no que diz respeito aos valores observados entre o grupo neutro-ácido e fisiológico, foi-se calculado o coeficiente de variação entre os dois grupos a partir dos valores absolutos de cada pH. No caso da proteína sem polímero, o que se observa é uma variação de 0,021, ou seja, de cerca de 2%, sendo o resultado estatisticamente igual entre as

amostras fisiológica e neutro-ácidas. Já para as amostras contendo o polímero, este coeficiente de variação se mantém próximo de 11% (0,109) entre esses grupos.

Figura 16 – Rendimento quântico de Triptofano da proteína BSA em presença de NAFION® (em 280 nm). Nas regiões: extremo ácido (de pH 2,0 a pH 4,0); ácido-neutro (de pH 5,0 a pH 6,0); neutro (pH 7,0); neutro-básico (de pH 8,0 a pH 9,0); e básico (de pH 10,0 a pH 12,0).

Fonte: Luiz Filipe Tzarbopoulos de Resende, 2019.

4.6 Estudos da conformação da proteína BSA em estado sólido: Preparação dos filmes

Os filmes foram produzidos com certas composições, nas quais fosse possível se realizar as medidas de forma a obter espectros de qualidade, visto que, diferentemente das amostras em solução, o caminho óptico reduzido dos substratos implica em uma menor quantidade em termos relativos da proteína estudada.

Primeiramente, foram preparados filmes utilizando-se as mesmas amostras dos experimentos em solução, o que resultou na incapacidade de medida experimentalmente, justamente associada a baixa concentração de proteína. Além disto houve divergência no

tempo de secagem da amostra, quando parte das amostras secaram com 24 horas, já outras, precisaram de 48 horas para secagem. Além de certas amostras apresentarem uma forma de halo em torno do filme (Figura 17A), relativo ao sal do tampão evaporado. Deste modo a fim de se compensar a quantidade de fótons (relativos a emissão e excitação dos aminoácidos fluorescentes da proteína BSA), as amostras foram concentradas cinco vezes. Ainda assim, não foram obtidos espectros de boa qualidade. Por esta razão decidiu-se concentrar a proteína em dez vezes, o que implicaria em uma concentração de proteína, equivalente a das amostras em solução. Estes filmes ainda assim apresentaram certos problemas de secagem e cristais de sais de tamponamento (Figura 17B).

Figura 17 – Amostras de BSA acrescidas de polímero Nafion®. (A) formação de halo ou depósito nas extremidades do filme (B) Secagem e aparecimento de grânulos de sal de tampão. (C) formação de extremidade uniforme, com concentração/precipitação da proteína ao centro.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

A fim de se corrigir problemas do estado sólido, foram feitos novos filmes a partir de amostras concentradas cinco vezes. Estes filmes foram secos 8 horas e após este período, ainda na forma aquosa, foram acrescidos de uma solução de tampão e BSA calculada para concentração final de dez vezes nos filmes. Pela observação dos substratos secos, nota-se maior depósito dos sais de tamponamento e precipitação da proteína no centro da amostra e um filme relativamente uniforme nas bordas (Figura 17C). Já no que diz respeito às amostras contendo o polímero Nafion®, também se pode observar que existe uma tendência nas amostras em valores de pH básicos (de 9,0 a 12,0), de que nestas extremidades, haja uma forma de fissuras no filme. Isto ocorre durante o processo de secagem da amostra e foi determinante durante as medidas das amostras em estado sólido.

4.7 Conformação secundária da BSA em Estado Sólido

Para os estudos de estado sólido, foram feitos, nesta etapa, os experimentos de CD apenas com os filmes de BSA com polímero Nafion®. A Figura 18 a seguir, ilustra esses resultados. É interessante notar que as conformações da BSA em estado sólido, em pH ácido são notadamente diferentes daquelas em solução. Ainda, a conformação em pH fisiológico (pH 7,0) se aproxima mais das conformações em pH ácidos do que básicos.

Figura 18 – Conformação secundária da proteína BSA na presença de Nafion® em tampão PBA em estado sólido sob variação de pH. (A) Conformação de proteína BSA com adição de Nafion® em valores de pH ácidos. (B) Conformação de BSA com adição Nafion® incubado em valores de pH neutro, fisiológico e básico. As amostras são apresentadas: pH 2,0 em preto, pH 3,0 em vermelho, pH 4,0 em azul, pH 5,0 em púrpura, pH fisiológico (7,0) em ouro e pH 8,0 em ciano.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Em valores de pH ácidos extremos (pH 2,0 e 3,0) existe uma conformação que não se parece com aquela encontrada na proteína nativa, tão pouco com o padrão observado nos valores de pH neutros e básicos. Também esta conformação se diferencia daquela observada em solução. Em pH ácido-neutro (5,0) e básico (8,0), se observa uma conformação que se assemelha aquela que se observa em solução, porém deslocado em direção ao vermelho. Apresentando um máximo positivo próximo de 227 nm e um proeminente mínimo em 240 nm, ou seja, deslocado cerca de 10 nm em relação a solução.

4.8 Fluorescência e vizinhança dos aminoácidos aromáticos em Estado sólido

A Figura 19 mostra o efeito do aumento da concentração de polímero na conformação da proteína BSA em pH fisiológico. Este aumento, perturba a exposição normal dos aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano (observado em 280 nm – Figura 19A) e triptofano sozinho (em 295 nm – Figura 19B). Bem como observado na emissão de

fluorescência das amostras em solução, a adição de polímero em proporção idêntica à de BSA (1:1), desloca os picos máximos de emissão. Para ambos aminoácidos aromáticos, tirosina e triptofano (em 280 nm), tem-se um deslocamento em direção ao azul de 12 nm, quando comparado a amostra de mesma proporção de proteína e polímero..

Figura 19 – Efeito do aumento de concentração de Nafion® sobre o espectro de Fluorescência da proteína BSA (A) Emissão em 280 nm (B) Emissão em 295 nm. Proteína sem adição de polímero (preto); proteína com adição de polímero em mesma proporção (vermelho); proteína com adição de polímero concentrado 5 vezes (azul); e proteína com adição de polímero concentrado 10 vezes (verde).

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Já na observação dos triptofanos, em 295 nm (Figura 19B), com aumento da concentração de Nafion® em dez vezes, além do deslocamento significativo de 26 nm, a amostra perde banda característica dos triptofanos. O que observamos com o aumento de concentração do polímero em ambos os casos, é a diminuição da intensidade e um

deslocamento que são diretamente proporcionais, uma vez que o deslocamento se distancia do ponto máximo de rendimento quântico em 340 nm. Com base nestes resultados, foram feitos novos filmes em substrato com amostras contendo tampão PBA 20 mM, polímero Nafion® e proteína concentrada dez vezes. Estes filmes foram secos utilizando dissecador com bomba a vácuo e sílica de secagem por 210 minutos.

Como pode-se observar na Figura 20, os filmes apresentam diferenças morfológicas em sua superfície. Em pH 7,0 o filme se mostra fosco em sua porção interna, já no seu entorno existe uma forma de halo translúcido. Os substratos em valores de pH do extremo-ácido (pH 2,0 e 3,0), apresentam grânulos de depósito de material, possivelmente proteína precipitada dentro da gota durante o processo de secagem. Os valores de pH 4,0, 5,0 e 6,0 tem sua superfície mais homogênea, onde não se pode notar grânulos, tão pouco a presença de um halo. Na condição neutro-básico (pH 8,0), temos um halo ainda mais proeminente, com heterogeneidade do filme após maior tempo de secagem. Já o filme sem proteína, ou seja, tampão em pH fisiológico e adição do polímero, percebe-se um filme mais homogêneo e não se nota a presença de halo.

Figura 20 – Substratos de estado sólido com amostras de proteína BSA com adição de Nafion®. Amostras de estado sólido com proteína BSA concentrada em 10 vezes e polímero em tampão PBA 20 mM comparados a tampão com proteína sem adição de polímero.

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

À partir dos filmes contendo Nafion® e a proteína BSA, foram feitos estudos quanto a emissão e excitação de fluorescência. Tal como em solução, a maior eficiência de excitação

para ambos aminoácidos aromáticos (tirosina e triptofano) ocorre em 280 nm e em 295 nm para triptofano. Estes resultados também foram agrupados, nas seguintes regiões: extremo ácido (de pH 2,0 a 4,0); neutro-ácido (de pH 5,0 a pH 6,0); neutro (pH 7,0); neutro-básico (de pH 8,0). A Figura 21, mostra a evolução dos picos máximos de emissão de fluorescência dos aminoácidos aromáticos em 280 nm da proteína BSA acrescida de polímero Nafion® em estado solido (filme). Como pode-se observar em pH 7,0 (neutro) o máximo se encontra em 322 nm, ou seja, um deslocamento em direção ao azul muito relevante, quando comparado as mesmas condições em solução (máximo em 333 nm). Esta conformação com aminoácidos menos disponíveis ou escondidos se repete em todas as amostras observadas. Nossos resultados mostram um deslocamento em direção ao azul, entre 319 e 323 nm, para os máximos de emissão na região que se estende do extremo ácido (pH 2,0) ao neutro básico (pH 8,0). Este deslocamento é indicativo de menor acessibilidade do cromóforo ao solvente.

Figura 21 – Espectro de fluorescência de aminoácidos aromáticos (em 280 nm) da proteína BSA com adição de Nafion® em estado sólido de tampão PBA. Dados de fluorescência normalizados obtidos pela técnica de espectroscopia sob variação de pH. Os diferentes valores de pH foram distribuídos em regiões: extremo ácido (de pH 2,0 a pH 4,0 - vermelho); ácido-neutro (de pH 5,0 a pH 6,0 - laranja); neutro (pH 7,0 - azul); neutro-básico (de pH 8,0– verde oliva).

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

A observação do triptofano em 295 nm (Figura 22) mostra, ainda, uma acentuação do deslocamento em direção ao azul. Este deslocamento se mostra ainda mais proeminente em pH neutro (pH 7,0) e neutro-básico (pH 8,0), com máximos de emissão em 312 e 315 nm, respectivamente. Apesar da amplitude do intervalo dos máximos de emissão, que se estende de 311 a 320nm, existe uma coerência clara do deslocamento, quando comparado estado sólido e solução.

Figura 22 – Espectro de fluorescência de aminoácidos aromáticos (em 295 nm) da proteína BSA com adição de Nafion® em estado sólido de tampão PBA. Dados de fluorescência normalizados obtidos pela técnica de espectroscopia sob variação de pH. Os diferentes valores de pH foram distribuídos em regiões: extremo ácido (de pH 2,0 a pH 4,0 - vermelho); ácido-neutro (de pH 5,0 a pH 6,0 - laranja); neutro (pH 7,0 - azul); neutro-básico (de pH 8,0– verde oliva).

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

5 DISCUSSÃO

Conformação secundária, em solução

A variação de pH a qual foi submetida a proteína sem adição de polímero, sugere que a conformação fisiológica se mantém praticamente a mesma nos valores de pH ácido-neutros (próximos ao pI). Somente havendo mudança significativa da estrutura secundária em valores de pH do extremo ácido, que pode ser observada pela diminuição das 2 bandas negativas em 209 e 222 nm. Esses dois últimos espectros sugerem a preservação de estrutura secundária regular, porém diferente da nativa, conformação essa típica de estados *molten globule* (Ptitsyn, 1995). Estes estados são uma forma de conformação intermediária entre a estrutura nativa e proteína completamente desnaturada, que se conservam em razão desta propriedade geralmente observada em proteínas globulares (Arai e Kuwajima, 2000). Esta característica concede as biomoléculas conservação de parte da estrutura, permitindo a sua reestruturação de forma ativa mesmo após exposição intensa a agentes desnaturantes e desequilíbrio do ambiente físico-químico. Em contrapartida, nos valores de pH acima de 7,0, também ocorre a manutenção da conformação e, apenas ocorre modificação, em pH 12,0, extremo básico. Ainda, em pH 12,0 ocorre desestabilização da estrutura secundária, com provável redução do conteúdo helicoidal, sem que ocorra desnaturação (Chudzik, *et al.*, 2016). Isto sugere a grande capacidade de BSA em resistir a grande variação do pH. Por outro lado, a adição de Nafion® parece causar relevante mudanças conformacionais. Estas mudanças são observadas em todos os valores de pH, do extremo ácido ao extremo básico, com espectros muito semelhantes entre si. Indicando assim que o polímero provoca desequilíbrio conformacional da proteína, desestabilizando a porção helicoidal nativa da proteína (Chudzik *et al.*, 2016).

Vizinhança dos aminoácidos aromáticos, em solução

O polímero parece causar instabilidade conformacional, que pode ser observada pelo deslocamento dos picos máximos de emissão em direção ao azul, como pode-se constatar nos espectros de emissão em 280 nm. Este deslocamento é causado pelo campo elétrico da interação entre a proteína e solvente, na presença de resíduos carregados negativamente perto da extremidade do benzeno, ou ainda positivas na extremidade do anel do triptofano (James e Patrik, 2001). Desta forma pode-se perceber que existe influência de Nafion® na restrição conformacional da proteína e, conseqüentemente, na exposição dos aromáticos. Este

comportamento se acentua quando observados apenas triptofanos, o que pode indicar uma mudança abrupta da exposição dos triptofanos quando em contato com o polímero.

Quanto a fluorescência de excitação, em ambos os casos, no intervalo de emissão do que se espera o máximo de emissão de triptofano (entre 330 e 340 nm), pode-se observar que este permanece como descrito na literatura, em torno de 280 nm. Entretanto como observado nos experimentos com o polímero Nafion®, existe um deslocamento em direção do visível de até 6 nm, que é mais perceptível nos valores de pH de transição entre ácido e neutro-ácido. Esta mudança, pode ainda, indicar uma transferência de energia na vizinhança aromática (Pierce e Boxer, 1995).

Rendimento Quântico

É importante se evidenciar que quando avaliados os valores obtidos experimentalmente para os grupos ácido-neutro e fisiológico em BSA e, comparados estes dois grupos, obtém-se valor de coeficiente de variação de 0,021, ou seja, a variação se mantém em torno de 2% em termos de números absolutos. Este resultado se dá em razão do *pI* da proteína, próximo de 4,7. Quando ultrapassado este limiar, ocorre uma mudança conformacional que coincide com a mudança observada no rendimento quântico dos aminoácidos aromáticos. Já nos valores de pH ácidos essa diminuição de rendimento é considerável e parece ocorrer em níveis, como uma escada. Diferentemente do que se observa em valores de pH neutro-básicos e básicos, que se mostra de forma mais linear, ocorrendo uma diminuição ainda mais aguda no rendimento, que é menor que 20% em pH 12,0 (extremo básico).

Com adição de polímero, observa-se um valor similar de rendimento quântico do aminoácido aromático triptofano. Os valores assemelham-se com os obtidos para a proteína sem adição de polímero na mesma condição de ambiente físico-químico, todavia o que se observa é uma leve queda nos valores relativos aos valores de pH neutro-básico e certa estabilidade da amostra em pH 12,0 (extremo básico) comparada a proteína.

Em relação ao rendimento quântico dos aminoácidos, pode-se concluir que não há diferença significativa entre seu valor (exposição conformacional) em pH próximo ao seu *pI* (próximo de 4,7) e o valor ótimo de pH sanguíneo (~7,3 e 7,4). Já em relação às variações entre os grupos com e sem a presença do polímero, observa-se que muito provavelmente exista uma ligação, que resulta em restrição conformacional, permitindo ao triptofano a

manutenção do rendimento quântico em pH 12,0 (ácido) acima de 30%, assemelhando-se ao que apresentam os valores de pH neutro-básicos (também na presença de Nafion®).

Estado Sólido

Apesar de favorecer a secagem, o aumento da concentração de polímero causa alteração do espectro de fluorescência de emissão da proteína. Este deslocamento é observado entre os espectros da proteína com e sem adição de Nafion®. Entretanto, este deslocamento é acentuado com o aumento da concentração de polímero, que concentrado dez vezes, afeta a emissão dos triptofanos da proteína. Em sua conformação menos disponível, perdem a banda característica de triptofano, comportamento observado também em extremo ácido, mesmo em menor concentração.

A observação das características morfológicas dos filmes, permite indagar quanto a formação de estrutura, que se assemelha a micelas. Essas estruturas, se formam durante a secagem do filme em valores de pH mais básicos. Também, a maior quantidade de grânulos, que se pode notar em valores de pH ácidos. Este comportamento coincide com a observação em solução, onde existe precipitação gradual da proteína com o aumento da acidez do tampão; e também, gradual aumento na taxa e rapidez de polimerização de Nafion®, com o distanciamento do pH fisiológico em direção ao básico.

As conformações observadas para a BSA com adição de polímero em estado sólido, são muito similares aquelas observadas em solução. O polímero parece ter um efeito deletério sobre a conformação nativa de BSA, que geralmente se assemelha a hélices. A conformação é caracterizada pela perda de um dos mínimos negativos (geralmente em 209 nm) e o deslocamento do máximo e segundo mínimo em direção ao visível ou *red-shift*.

O deslocamento de fluorescência de excitação em direção ao azul, apesar de observado em valores de pH extremos, quando em solução, é bem acentuado em estado sólido. O deslocamento dos máximos em 280 e 295 nm é possivelmente um indicativo da restrição conformacional causada não somente pelo próprio pH em estado sólido, mas pela menor mobilização da proteína e restrição, provavelmente causada pelo polímero Nafion®.

Compêndio

Sobre a influência do polímero Nafion® na proteína, apesar da bibliografia relatar seu uso como membrana inerte de biossensores conjugados com BSA (Xuejiang *et al.*, 2006), ou ainda, BSA como agente de bloqueio de atividade de monocamada “nano-Au” para condução

de antígeno carcinoembrionário (Liao *et al.*, 2010), este polímero causa importantes mudanças conformacionais e interações com a proteína em questão. Além de deslocar consideravelmente os máximos de emissão - comparada à proteína sem adição de polímero e outras formas de desnaturação (Malarkani *et al.*, 2017) – indicando menor exposição dos triptofanos ao solvente, observada por fluorescência (James e Patrik, 2001) e mudanças na porção helicoidal da proteína (Chudzik, M. *et al.*, 2016).

6 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que, de fato, a proteína modelo BSA, tem conformação relativamente estável frente à mudanças do ambiente físico-químico pela variação de pH. Como observado, as modificações conformacionais, somente são significativas nos extremos básico (pH 12,0) e ácido (pH 2,0 e 3,0), onde ocorre atenuação dos mínimos negativos. Em ambiente ácido, identifica-se a conservação mínima de estrutura secundária regular, mesmo que não nativa, característica atribuída aos estados *molten globule*. Quanto às vizinhanças aromáticas, ambos ambientes extremos causam um deslocamento em direção ao azul, que indica uma menor exposição dos aminoácidos aromáticos, quando comparados aos valores de pH ótimos (acima do ponto isoelétrico da proteína, pH 5,0 e fisiológico, pH 7,0). Isto também se reflete no rendimento quântico da proteína, que é diminuído quando distante da faixa ótima.

O polímero Nafion® se mostra determinante na conformação e estrutura da proteína BSA. Contrariamente ao que se etendia, como comportamento inerte entre proteína e polímero, ocorrem interações e mudanças conformacionais importantes. Estas interações provocam inclusive perda da estrutura helicoidal. Apesar de favorecer o rendimento dos valores de pH do extremo básico, o polímero provoca uma queda global do rendimento quântico dos triptofanos de BSA. Ademais, a relação proteína-polímero causa desequilíbrio conformacional, deslocando os máximos de emissão fluorescência e, conseqüentemente, alterando a exposição dos aromáticos.

7 CONTINUIDADE DESTE TRABALHO

A conformação da BSA em várias condições físico-químicas está sendo estudada por Atividade Óptica Raman (ROA). Esses estudos, juntamente com os resultados deste trabalho, acrescentando-se os estudos de CD dos filmes na ausência de Nafion® e a desconvolução de todas as estruturas, deverão compor um artigo científico a ser publicado em revista de seletiva política editorial.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, C.; BERTORELLO, H.; STRUMLA, M.; SANCHEZ, E.I. (1996). Preparation and characterization of new biospecific adsorbents with fatty acids as ligands, usable to retain bovine serum albumin. **Polymer**, 37 (16), p. 3715-3719.
- ARAI, M., & KUWAJIMA, K. (2000). Role of the molten globule state in protein folding. **Protein Folding Mechanisms**, 209–282.
- BANKAR, S.B.; BULE, M.V.; SINGHAL, R.S.; ANANTHANARAYAN, L. (2009) Glucose oxidase — An overview. **Biotechnology Advances** 27(4):489-501.
- BARONDEAU, D.P. ; KASSMANN, C.J.; BRUNS, C.K.; TAINER, J.A.; GETZOFF, E.D. (2004) **Biochemistry edition** 43: 8038–8047
- BASILIO, F.C.; CAMPANA, P. T.; THERÉZIO, E. M.; BARBOSA NETO, N.n M.; SEREIN-SPIRAU, F.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, O. N.; MARLETTA, A. (2016) Ellipsometric Raman Spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry. C**, v. 120, p. 25101-25109
- CAMPANA, P. T.; BARBOSA, L. R.S.; ITRI, R. (2011). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 398-402.
- CANTOR, C.R.; SCHIMMEL P.R. (1980) **Biophysical Chemistry**. Techniques for the Study of Biological Structure and Function. San Francisco, W H Freeman.
- CARRIÓ, M. M. and VILLAVERDE, A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **Journal of Biotechnology**. 96, 3–12.
- CASALS, E.; PFALLER, T.; DUSCHL, A.; Oostigh, G.J.; PUNTES, V. (2010) Time evolution of nanoparticle protein corona. **ACS Nano**. 2010, 4, 7, 3623-3632.
- CEDERVALL, T.; LYNCH, I.; LINDMAN, S.; BERGGÅRD, T.; THULIN, E.; NILSSON, H.; DAWSON, K.A.; LINSE, S. (2007) Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **PNAS** 104(7): 2050 –2055.
- FLORIO, D. Z.; CAMPANA, Patrícia T. (2011) **Preparação e caracterização por espectroscopia de impedância eletroquímica de biosensores à base de proteína PNA sobre substratos cerâmicos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Nanociências e Materiais Avançados) - Universidade Federal do ABC.
- FOGUEL D.; WEBER G. (1995) **J BiolChem.**; 270(48): 28759-28766
- FREALLE, E.; NOEL, C.; NOLARD, N; SYMOENS, F.; FELIPE, M.S.; DEI-CAS, E.; CAMUS, D.; VISCOGLIOSI, E.; DELHAES, L.; Mol. (2006) **Phylogenetic Evolution**. 41: 28–39.
- GREENFIELD, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, 1(6), 2876–2890.
- GUEDIRA, F. UNIVERSITÉ MOHAMMED V-AGDAL. Curso de espectroscopia ultravioleta. **CAPÍTULO I**. Application de la spectroscopie electronique aux composés de coordination. Disponível em: <<http://www.fsr.ac.ma/cours/chimie/GUEDIRA/Master%20de%20Sciences%20Analytiques-M9%20Spectr.%20UV-visible/Word/CHAPITRE%20I-spectroscopie%20d'absorption%20UV-visible.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2016.
- GUINIER A.; FOURNET G. (1955) **Small Angle Scattering of X-Rays**, 1st ed., Wiley, New York.
- GUO, F.X.; SHI-JIN, E.; LIU, S. A.; CHEN, J.; LI, D.C. (2008) **Mycology** 100: 375–380.
- HEALTHCARE, G. E. Recombinant Protein Purification Handbook. Principles and Methods. **Methods**. 2009, 41(10), 205-211.

- HERMAN, B. et al. Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals. **Olympus**, 2011. Disponível em: <<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscoperesource/primer/techniques/confocal/fluoroexciteemit/>>. Acesso em: 5 Fevereiro 2018.
- JAMES T. V. AND PATRIK R. C. (2001) Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. **Biophysical Journal**, 2001, Volume 80 p. 2093–2109
- JAMESON D.M.; CRONEY J.C.; MOENS P.D.J. (2003) **Methods in Enzymology** 360: 1-43.
- KELLY S.M.; PRICE N.C. (2000) **Current Protein and Peptide Science**, 1: 349-384.
- LAKOWICZ, J. R.(1999) Energy transfer. In: Principles of fluorescence spectroscopy. **Springer**, p. 367-394.
- LI, D.C.; GAO, J.; LI, Y.L.; LU, J. (2005) **Extremophiles**. 9: 1–6.
- LIAO, Y., YUAN, R., CHAI, Y., ZHUO, Y., & YANG, X. (2010). Study on an amperometric immunosensor based on Nafion–cysteine composite membrane for detection of carcinoembryonic antigen. **Analytical Biochemistry**, 402(1), 47–53. doi:10.1016/j.ab.2010.03.015
- LYNCH, T.; CEDERVALL, I.; LUNDQVIST, T.; CABALEIRO-LAGO, M.; LINSE, C.; DAWSON, S.; K.A. (2007) The nanoparticle – protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. **Advances in Colloid and Interface Science** 134–135: 167 – 174.
- MAJOREK, K. A., POREBSKI, P. J., DAYAL, A., ZIMMERMAN, M. D., JABLONSKA, K., STEWART, A. J., CHRUSZCZ, M. AND MINOR, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular immunology**, 52(3-4), 174-82.
- MALARKANI, K., SARKAR, I., & SELVAM, S. (2017). Denaturation studies on bovine serum albumin-bile salt system: Bile salt stabilizes bovine serum albumin through hydrophobicity. **Journal of pharmaceutical analysis**, 8(1), 27-36.
- MECHERI, B.; D’EPIFANI, A.; GERACITANO A.; CAMPANA, P.T.; LICOCCIA S. (2012). Development of glucose oxidase bioanodes for enzymatic fuel cell applications. In: **GEIERA2012**, 17 – 22 Giugno, Santa Marina Salina, Messina, Italy.
- MECHERI, B.; PORCELLINIS, D.; CAMPANA, P. T.; RAINER, A.; TROMBETTA, M.; MARLETTA, A.; OLIVEIRA JR., O. N.; and LICOCCIA, S. (2015). Tuning Structural Changes in Glucose Oxidase for Enzyme Fuel Cell Applications. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, 2015, 7 (51), pp 28311–28318
- PASTOR, J.; BÍSCARO, H.; CAMPANA, P.T. (2014). CDPro CD spectra deconvolution programs upgraded. Disponível em: <http://each.usp.br/aprender-ciencia/cdpro_win7.php>.
- PEDRAZ, P.; MONTES, F. J.; CERRO, R. L.; DÍAZ, M. E. (2012). Characterization of Langmuir biofilms built by the biospecific interaction of arachidic acid with bovine serum albumin. **Thin Solid Films**. v. 525: 121-131.
- PIERCE, D.W.; BOXER, S.G. (1995) **Biophysics Journal**. 68: 1583-1591.
- PTITSYN, O. B. (1995). Molten Globule and Protein Folding. **Advances in Protein Chemistry** Volume 47, 83–229.
- QUARANTA; MICHELA; SERGEY M.; BORISOV; and INGO KLIMANT (2004). Indicators for Optical Oxygen Sensors. **Bioanalytical Reviews** 4.2-4:115–157.
- ROYER, C.A. (1990) **Biochemistry**, 29, 4959-4966
- ROYER, C.A. (2006) **Chem. Rev.** 106: 1769-1784.
- SAHOO, B.; GOSWAMI, M.; NAG, S.; MAITI, S. (2007). Spontaneous formation of a protein corona prevents the loss of quantum dot fluorescence in physiological buffers. **Chemical Physics Letters** 445: 217–220.
- SAMPAIO, R. N.; PORTUGUAL, R. J.; MARLETTA, A. **Estudos espectroscópicos em Blendas de MEH-PPV com PMMA**. Universidade Federal de Uberlândia – INFIS, Não publicado.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. (1993). A Self-Consistent Method for the analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. **Analytical Biochemistry** 209: 32-44.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. (1994). Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. **J. Mol. Biol.** 242:497-507.

SREERAMA, N. *et al.* (2000). Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. **Analytical Biochemistry**. December 15, Pages 243-251.

THOMAS, N. C. (1991). The Early History of Spectroscopy. **Journal of Chemical Education**. v. 68 Number 8: 631-634

VO-DINH T. (2007). Nanotechnology in Biology and Medicine: Methods, Devices, and Applications. Second Edition. **CRC Press**, 2007. p. 310-311.

XUEJIANG, W., DZYADEVYCH, S., CHOVELON, J., RENAULT, N., LING, C., SIQING, X., & JIANFU, Z. (2006). Conductometric nitrate biosensor based on methyl viologen/Nafion®/nitrate reductase interdigitated electrodes. **Talanta**, 69(2), 450–455.

WOODY, R.W.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K. (1994) **Circular Dichroism: Principles and applications**. VCH publishers, NY, USA.

WOODY R.W. *and* DUNKER A.K., (1996) Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules. **Fasman, G.D. editor, Plenum Press**, New York, chapter 4, 109.

WOODY, R. W., *and* DUNKER, A. K., (1996). Aromatic and cystine side-chain circular dichroism in proteins. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. **Fasman GD editor, Plenum Press**. New York, pp 109-157.

YUMEI, L.; ZHIQIANG, F.; KEJUN, D.; YIFENG, T. (2009) Study on a pyruvate oxidase biosensor based on β -cyclodextrin with ferrocene as electron-transfer mediator. **Analytical Letters**. 42: 312–322.

ZEINALI, F.; HOMAEI, A.; KAMRANI, E. (2015) Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 627–637.

ZHAO, Y.; YAN, X.; KANG, Z.; LIN, P.; FANG, X.; LEI, Y.; MA, S.; ZHANG, Y. (2013) Highly sensitive uric acid biosensor based on individual zinc oxide micro/nanowires. **Microchim. Acta** 180: 759–766.

ANEXO A - MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1 – Amostras de BSA em triplicata nos diferentes valores de pH variando de 2,0a 12,0. As amostras foram preparadas de forma individual e independente afim de se eliminar problemas de contaminação, erros de concentração entre outros. Esta tabela tem por objetivo expor os valores obtidos de densidade óptica (DO) e concentração proteica teórica calculada em mg/mL a partir destes valores de DO.

	Amostra A		Amostra B		Amostra C	
	Densidade Óptica (u.A.)	mg/mL aprox.	Densidade Óptica (u.A.)	mg/mL aprox.	Densidade Óptica (u.A.)	mg/mL aprox.
pH 2,0	0.913	1.38	0.863	1.31	0.993	1.50
pH 3,0	0.954	1.44	1.175	1.78	1.192	1.81
pH 4,0	0.974	1.47	1.165	1.77	1.216	1.84
pH 5,5 (>PI)	0.994	1.50	1.248	1.88	1.136	1.72
pH 6,0	1.029	1.55	1.132	1.72	1.145	1.73
pH 7.2	0.859	1.30	1.223	1.85	0.977	1.48
pH 8,0	1.066	1.61	1.209	1.83	1.055	1.60
pH 9,0	0.987	1.49	1.103	1.67	1.114	1.69
pH 10,0	1.015	1.53	0.945	1.43	1.115	1.69
pH 11,0	1.033	1.56	0.915	1.39	0.844	1.28
pH 12,0	1.129	1.70	1.316	1.99	1.177	1.78

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

Tabela 2 – Amostras de BSA e BSA com adição do polímero Nafion® nos diferentes valores de pH variando de 2,0a 12,0. Esta tabela tem por objetivo expor os valores obtidos de densidade óptica (DO) e concentração proteica teórica calculada em mg/mL a partir destes valores de DO.

	Amostras em Solução para Fluorescência				Amostras em Solução para Dicroísmo Circular			
	BSA		BSA + Nafion		BSA		BSA + Nafion	
	Densidade Óptica	mg/mL aprox.	Densidade Óptica	mg/mL aprox.	Densidade Óptica	mg/mL aprox.	Densidad e Óptica	mg/mL aprox.
pH 2,0	0,913	1,385	0,931	1,412	0,836	1,268	0,909	1,379
pH 3,0	0,954	1,447	0,849	1,288	0,920	1,395	0,992	1,505
pH 4,0	0,974	1,978	0,822	1,247	0,948	1,438	1,006	1,526
pH 5,0 (>PI)	0,994	1,508	0,822	1,247	1,017	1,543	0,923	1,400
pH 6,0	1,029	1,561	0,963	1,461	0,889	1,348	0,876	1,329
pH 7,0	0,859	1,303	0,801	1,215	0,835	1,267	0,972	1,475
pH 8,0	1,066	1,608	0,803	1,218	0,942	1,429	1,051	1,538
pH 9,0	0,987	1,497	0,848	1,286	0,925	1,403	1,014	1,595
pH 10,0	1,015	1,540	0,802	1,217	0,931	1,412	0,9019	1,394
pH 11,0	1,033	1,567	1,040	1,578	0,886	1,344	0,902	1,368
pH 12,0	1,129	1,713	0,905	1,373	0,890	1,350	0,968	1,469

Fonte: Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende, 2019.

ANEXO B - FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura Suplementar 1 – Espectro de excitação de aminoácidos aromáticos (em 340 nm) da proteína BSA com e sem adição de Nafion® em tampão PBA. (A) Proteína BSA sem NAFION®. (B) Proteína BSA com adição de NAFION®. Dados de fluorescência normalizados, obtidos pela técnica de espectroscopia sob variação de pH. Os diferentes valores de pH foram distribuídos em regiões: extremo ácido (de pH 2,0 - vermelho); ácido-neutro (de pH 5,0 - laranja); neutro (pH 7,0 - azul); neutro-básico (pH 9,0 – verde oliva); e básico (pH 12,0 - magenta).

Fonte: Luiz Filipe Tzarbopoulos de Resende, 2019.

Figura Suplementar 2 – Espectro de fluorescência de triptofano (em 295 nm) da proteína BSA com e sem adição de Nafion® em tampão PBA. (A) Proteína BSA sem NAFION®. (B) Proteína BSA com adição de NAFION®. Dados de fluorescência normalizados, obtidos pela técnica de espectroscopia sob variação de pH. Os diferentes valores de pH foram distribuídos em regiões: extremo ácido (de pH 2,0 - vermelho); ácido-neutro (de pH 5,0 - laranja); neutro (pH 7,0 - azul); neutro-básico (pH 9,0 – verde oliva); e básico (pH 12,0 - magenta).

Fonte: Luiz Filipe Tzarbopoulos de Resende, 2019.