Universidade de São Paulo

Instituto de Física de São Carlos
Instituto de Química de São Carlos
Escola de Engenharia de São Carlos

THAÍS FERNANDES SCHMIDT

**Estudo da interação da peroxidase de raiz forte em interfaces
nanoestruturadas**

SÃO CARLOS

2008

THAÍS FERNANDES SCHMIDT

**Estudo da interação da peroxidase de raiz forte em interfaces
nanoestruturadas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr.

São Carlos
2008

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.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Referência
do Serviço de Biblioteca e Informação – IFSC/USP

Schmidt, Thaís Fernandes

Estudo da interação da peroxidase de raiz forte em
interfaces nanoestruturadas/ Thaís Fernandes Schmidt; orientador
Osvaldo Novais de Oliveira Junior. São Carlos, 2008.

150p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais. Área de
Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de
Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física
de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaís Fernandes Schmidt

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovada em: 01/08/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli

Instituição: FFCLRP/USP

Assinatura

Profa. Dra. Debora Gonçalves

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

AGRADECIMENTOS

As pessoas que passam em nossas vidas sempre deixam marcas em nosso caminho. Algumas em especial, deixam pegadas para a eternidade. Todos que contribuíram para que este trabalho fosse concluído de certa forma deixaram sua marca aqui. É sempre injusto mencionar somente alguns pelo nome, deixando anônimos todos os outros que contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade. Ainda assim não poderia jamais deixar de agradecer a Deus pela bênção da vida; ao meu orientador, Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr., pela orientação e por toda a sabedoria transmitida; ao Prof. Dr. Luciano Caseli por ter acompanhado e auxiliado este trabalho do começo ao fim; aos amigos e colegas de trabalho Karla, Felipe, Lucinéia e Vanessa pelas horas de discussão e momentos de alegria; aos técnicos Ademir, Débora Balogh, Bertho e Níbio pelo incansável suporte e é claro, a toda minha família que esteve sempre presente. Assim, deixo meus mais sinceros agradecimentos às pessoas que fizeram parte desse trabalho, que me apoiaram e me incentivaram a sempre continuar, nunca desistir.

À FAPESP (Processo: 05/57412-2) pelo apoio financeiro essencial no desenvolvimento desse trabalho.

Os tesouros da impiedade de nada aproveitam; mas a justiça livra da morte. (Provérbios, 10:2)

RESUMO

SCHMIDT, T. F. **Estudo da interação da peroxidase de raiz forte em interfaces nanoestruturadas**. 2008. 150 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Neste projeto estudou-se a interação da enzima peroxidase de raiz forte (HRP) em interfaces nanoestruturadas e sua possível aplicação em biossensores de peróxido de hidrogênio. Foram utilizadas as técnicas de Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB) e automontagem por adsorção física para formar filmes nanoestruturados. A interação da enzima com espécies em interfaces foi investigada com materiais que serviram de matrizes de adsorção, ou seja, a quitosana (Ch) e o fosfolipídio 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)] (sal de sódio) (DPPG). Os filmes de Langmuir foram caracterizados com medidas de pressão e potencial de superfície, espectroscopia no infravermelho, e tensão superficial dinâmica. Para os filmes LB e automontados, empregaram-se espectroscopias de fluorescência, ultravioleta-visível e infravermelho e microgravimetria por cristal de quartzo. A peroxidase de raiz forte apresentou forte interação com DPPG, confirmada em filmes de Langmuir por medidas de pressão de superfície, elasticidade dinâmica e de espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho, com modulação por polarização (PM-IRRAS). A massa de peroxidase transferida em filmes Langmuir-Blodgett (LB) mistos com DPPG foi de aproximadamente 200 ng, de acordo com medidas com uma microbalança de cristal de quartzo. A atividade da HRP foi mantida no filme LB, inclusive com atividade catalítica maior do que em meio homogêneo e nos filmes automontados com quitosana. As medidas de atividade não afetaram a morfologia dos filmes LB, estudada com microscopia de força atômica (AFM), ao contrário dos filmes automontados.

Conclui-se que a imobilização de HRP é mais eficiente num filme LB, com matriz fosfolipídica, apresentando boas perspectivas de emprego em biossensores de peróxido de hidrogênio.

Palavras-Chave: Filmes de Langmuir. Langmuir-Blodgett. Biossensores. Peroxidase de Raiz Forte.

ABSTRACT

SCHMIDT, T. F. **Study of horseradish peroxidase interaction in nanostructured interfaces.** 2008. 150 f. Dissertation (Master degree) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

A study has been performed on the interaction of the enzyme horseradish peroxidase (HRP) in nanostructured interfaces and their possible application in biosensors for hydrogen peroxide. The nanostructured films were obtained with the Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB) and layer-by-layer (LbL) methods. The interaction between HRP and species at interfaces was investigated using materials that served as matrix for immobilization, viz. chitosan (Ch) and the phospholipid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phosphatidyl-rac-(1-glycerol)] (sodium salt) (DPPG). The Langmuir films were characterized with surface pressure, surface potential, elasticity measurements and polarization-modulation reflection and absorption infrared spectroscopy (PM-IRRAS). For LB and LbL films, use was made of fluorescence, absorption in the UV-vis. and infrared spectroscopy. HRP displayed strong interaction with DPPG, which was confirmed in Langmuir films with measurements of surface pressure, dynamic elasticity and PM-IRRAS. The mass of HRP transferred onto a solid support in a mixed LB film with DPPG was 200 ng, according to data from a quartz crystal microbalance. The HRP activity was preserved in the mixed LB film, with a catalytic activity that was even higher than in solution or in LbL films of HRP/Ch. The catalytic activity measurements did not affect the morphology of the LB films, studied with atomic force microscopy (AFM), in contrast to the LbL films. The main conclusion is that HRP immobilization is more efficient in an LB film with a phospholipid matrix, with good prospects for developing biosensors for hydrogen peroxide.

Keywords: Langmuir monolayers. Langmuir-Blodgett films. Biosensors. Horseradish Peroxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do ácido esteárico.....	24
Figura 2	Exemplo de um fosfolipídio, no caso, DPPG.....	25
Figura 3	Representação estrutural em três dimensões da peroxidase de raiz forte (HRP).....	27
Figura 4	Estrutura molecular da quitosana.....	29
Figura 5	Representação de uma cuba de Langmuir em funcionamento.....	30
Figura 6	Representação esquemática da deposição de um filme LB e seus diferentes tipos de deposição, na seqüência: X, Y e Z.....	31
Figura 7	Ilustração esquemática de preparação de filmes automontados.....	33
Figura 8	Perfil de uma isoterma para ácido esteárico com os três estados análogos à matéria.....	35
Figura 9	Perfil de uma curva de potencial de superfície para DPPG.....	37
Figura 10	Imagem de uma gota pendente.....	38
Figura 11	Equipamento utilizado no método da gota pendente.....	39
Figura 12	Em a): vista superior e inferior de um crista de quartzo com ouro (Au) depositado; b): célula pra cristal piezelétrico com freqüencímetro e sistema oscilador; c): gráfico que representa a relação entre freqüência de oscilação do quartzo em função do tempo. <i>Figura retirada de DAMOS, F.S., Mendes, R.K., Kubota, L.T., Quím. Nova, 27, 6, 970-979, 2004.</i>	40
Figura 13	Ilustração esquemática da radiação p- e s- polarizada.....	42
Figura 14	Ilustração esquemática do funcionamento de um fluorímetro.....	43
Figura 15	Isotermas de DPPG com e sem tampão na subfase.....	52
Figura 16	Isotermas de DPPG e DPPG/HRP em solução tampão.....	53
Figura 17	Gráfico de fator de compressibilidade vs área por molécula para monocamdas de DPPG e DPPG/HRP.....	54

Figura 18	Gráfico de fator de compressibilidade vs pressão de superfície para as monocamadas lipídicas sem HRP e com HRP.....	54
Figura 19	Curvas de pressão de superfície a diferentes tipos de coespalhamento de DPPG/HRP.....	56
Figura 20	Fator de compressibilidade vs área por molécula para monocamadas lipídicas e lipídicas mais HRP.....	57
Figura 21	Fator de compressibilidade vs pressão de superfície para as monocamadas lipídicas sem HRP e com HRP.....	58
Figura 22	Pressão superficial em filmes de Langmuir de DPPG/HRP para diferentes concentrações enzimáticas.....	59
Figura 23	Curva de potencial para DPPG e para DPPG com a enzima.....	60
Figura 24	Tensão superficial da solução enzimática em água.....	61
Figura 25	Tensão superficial da solução enzimática após a inserção de DPPG na superfície a uma pressão fixa.....	62
Figura 26	Gráfico de pressão de superfície inicial vs. diferença de pressão do sistema DPPG/HRP.....	64
Figura 27	Cinética de adsorção a pressão inicial de 10 mN/m.....	65
Figura 28	Cinética de adsorção a uma pressão de superfície inicial de 20 mN/m...	66
Figura 29	PM-IRRAS da enzima HRP adsorvendo sozinha na interface ar-água. Encarte à direita: Cinética de adsorção.....	67
Figura 30	HRP adsorvendo na monocamada de DPPG pré-formada a uma pressão inicial de 10 mN/m na faixa de 2800 cm ⁻¹ a 3000 cm ⁻¹ . Encarte à direita: Cinética de adsorção.....	68
Figura 31	HRP adsorvendo na monocamada de DPPG pré-formada a uma pressão inicial de 10 mN/m na faixa de 1500 cm ⁻¹ a 1700 cm ⁻¹	69
Figura 32	Modelo para a adsorção da HRP numa interface ar-água em duas situações. À da esquerda, numa interface sem lipídios. À da direita, adsorção numa camada de DPPG pré-formada, na qual o eixo maior da enzima está orientado perpendicularmente à superfície.....	70
Figura 33	PM-IRRAS de DPPG durante isotermas a diferentes pressões de superfície.....	71

Figura 34	PM-IRRAS de monocamadas mistas de DPPG e HRP durante a isoterma a diferentes pressões.....	72
Figura 35	PM-IRRAS de monocamadas mistas de DPPG/HRP a diferentes pressões entre 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}	73
Figura 36	Ilustração esquemática da deposição de filmes mistos de DPPG/HRP.....	76
Figura 37	Espectro UV-vis para HRP em solução.....	77
Figura 38	Espectro UV-vis para filme LB de DPPG/HRP.....	78
Figura 39	Espectro de fluorescência para solução de HRP.....	79
Figura 40	Espectroscopia de fluorescência para filme LB de DPPG/HRP.....	79
Figura 41	PM-IRRAS em filme LB de DPPG/HRP na região entre 1500 e 1700 cm^{-1}	80
Figura 42	PM-IRRAS em filme LB de DPPG/HRP entre 1000 e 1300 cm^{-1}	81
Figura 43	PM-IRRAS para HRP em filme de Langmuir entre 1000 e 1300 cm^{-1} ..	81
Figura 44	Microscopia óptica para filme LB de DPPG-HRP antes de medida de atividade enzimática. Imagem da amostra aumentada 40 vezes. Na escala menor: 5 μm	82
Figura 45	Microscopia óptica para filme LB de DPPG-HRP depois de medida de atividade enzimática. Imagem da amostra aumentada 40 vezes. Na escala menor: 10 μm	82
Figura 46	AFM do suporte sólido antes de depositado o filme LB.....	83
Figura 47	AFM de filme LB de DPPG-HRP antes da medida de atividade enzimática.....	83
Figura 48	AFM de filme LB de DPPG-HRP após medida de atividade enzimática.....	84
Figura 49	Atividade enzimática para filme LB de DPPG/HRP.....	86
Figura 50	Reação da transformação de pirogalol em purpurogalina na presença de peróxido de hidrogênio e peroxidase.....	86
Figura 51	Curva de variação da frequência vs tempo de adsorção para cada bicamada de Ch/HRP.....	90

Figura 52	Curva de relação entre número de bicamadas com o tempo.....	90
Figura 53	Variação de massa e variação da frequência com relação ao tempo de deposição.....	91
Figura 54	Crescimento de filme LbL Ch/HRP por UV-vis.....	92
Figura 55	Crescimento de filme LbL CH/HRP por fluorescência.....	93
Figura 56	Variação do número de bicamadas formadas com a absorbância em filme LbL de Ch-HRP.....	94
Figura 57	Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP antes de medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 20 vezes. Na escala menor: 20 μm	95
Figura 58	Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP antes de medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 40 vezes. Na escala menor: 10 μm	95
Figura 59	Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP antes de medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 100 vezes. Na escala menor: 5 μm	96
Figura 60	Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP após medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 20 vezes. Na escala menor: 20 μm	97
Figura 61	Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP após medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 40 vezes. Na escala menor: 10 μm	97
Figura 62	Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP após medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 100 vezes. Na escala menor: 5 μm	98
Figura 63	AFM de filme LbL de Ch-HRP antes da medida de atividade enzimática.....	99
Figura 64	AFM de filme LbL de Ch-HRP após medida de atividade enzimática..	99
Figura 65	Atividade enzimática para filme LbL de Ch/HRP.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de elasticidade dinâmica variando-se a pressão superficial somente para o fosfolipídio e posteriormente com a enzima.....	63
----------	---	----

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

HRP – peroxidase de raiz forte

DPPG - (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)] (sal de sódio)

DMPA - Ácido dimiristoil fosfatídico

LB – Langmuir-Blodgett

LbL – layer-by-layer

Ch - quitosana

UV-vis – espectroscopia na região do ultra-violeta e do visível

PM-IRRAS – espectroscopia infravermelha de reflexão e absorção - modulação por polarização

FTIR – Fourier Transform Infrared – espectroscopia no infravermelho

QCM – microbalança de cristal de quartzo

AFM – microscopia de força atômica

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

NaCl – cloreto de sódio

HCl – ácido clorídrico

NaOH – hidróxido de sódio

KMnO₄ – permanganato de potássio

NH₄OH – hidróxido de amônio

RT – razão de transferência

Abs – absorbância

π – pressão de superfície

C_s^{-1} – fator de compressibilidade

ΔV – potencial de superfície

γ – tensão superficial

γ_0 – tensão superficial inicial

A_c – área efetiva do cristal de quartzo

F_0 – frequência inicial do quartzo

ΔF – variação de frequência

Δm – variação de massa

$\Delta \Pi$ – variação de pressão

Π_i – pressão inicial

E – elasticidade dinâmica

E_r – elasticidade real

E_i – elasticidade imaginária

Δ – variação da absorbância no tempo

C – concentração da enzima

L – comprimento da amostra

ϵ – constante de Lambert

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	20
1. Introdução.....	20
1.1. Objetivos.....	22
Capítulo 2.....	24
2. Materiais e métodos.....	24
2.1. Ácidos graxos.....	24
2.2. Fosfolipídios.....	25
2.3. Peroxidase de raiz forte.....	26
2.4. Quitosana.....	28
2.5. Filmes nanoestruturados.....	29
2.5.1. Filmes de Langmuir.....	29
2.5.2. Filmes Langmuir-Blodgett.....	30
2.5.3. Filmes automontados.....	32
2.6. Técnicas de caracterização.....	33
2.6.1. Pressão de superfície.....	33
2.6.2. Fator de compressibilidade.....	35
2.6.3. Potencial de superfície.....	36
2.6.4. Elasticidade dinâmica.....	37
2.6.5. Microbalança de cristal de quartzo.....	39
2.6.6. PM-IRRAS.....	41

2.6.7. Espectroscopia de fluorescência.....	42
Capítulo 3.....	45
3. Procedimentos experimentais.....	45
Capítulo 4.....	51
4. Resultados e discussão para monocamadas de Langmuir.....	51
4.1. Filmes de Langmuir de DPPG.....	51
4.2. Interação enzima/fosfolipídio.....	52
4.3. Diferentes formas de incorporação de HRP em filmes de DPPG.....	55
4.4. Potencial de superfície.....	59
4.5. Elasticidade dinâmica.....	60
4.6. Cinética de adsorção.....	65
4.7. PM-IRRAS.....	66
4.8. Conclusões.....	73
Capítulo 5.....	75
5. Resultados e discussão para filmes Langmuir-Blodgett.....	75
5.1. Transferência dos filmes de Langmuir para suportes sólidos.....	75
5.2. Espectroscopia de fluorescência e de ultravioleta visível em filmes LB.....	77
5.3. Infravermelho em filmes LB.....	80
5.4. Microscopia óptica.....	82
5.5. Microscopia de força atômica.....	83
5.6. Atividade enzimática.....	84
5.7. Conclusões.....	88
Capítulo 6.....	89
6. Resultados e discussão para filmes automontados.....	89

6.1. Microgravimetria e crescimento de filme.....	89
6.2. Microscopia óptica.....	94
6.3. Microscopia de força atômica.....	98
6.4. Atividade enzimática.....	100
6.5. Conclusões.....	101
Capítulo 7.....	102
7. Conclusões finais e perspectivas futuras.....	102
Referências.....	104
Anexo I.....	110
Anexo II.....	116

Capítulo 1

1. Introdução

Um importante aspecto da nanobiociência é a elaboração de sistemas controlados em escala nanométrica para melhor estudar mecanismos de funcionamento de biomoléculas em escala molecular. A elaboração controlada de sistemas em nanoescala requer a organização dos átomos e moléculas em espaço bi ou tridimensional; assim, a eficiência da nanofabricação e o desenvolvimento recente dos métodos que permitem caracterização direta na escala molecular abrem nova maneira de desenvolver nanoestruturas auto-organizadas. A habilidade de moléculas anfífilas se auto-organizarem, como os lipídios, pareceu ser um conceito apropriado para o desenvolvimento de modelos biomiméticos¹. A relação entre sistemas biomiméticos e nanobioeletrônicos se encontra no coração da nanobiociência, oferecendo meio direto de relacionar os dois sistemas e aplicá-los a biossensores, por exemplo. Biossensores, e no caso específico, sensores de peróxido de hidrogênio, podem ser utilizados em indústrias farmacêuticas e alimentícias em que o peróxido é um possível efluente industrial. Nessas indústrias, o sensor seria empregado no controle de resíduos industriais evitando impacto ambiental, caso uma quantidade de peróxido fosse descartada no meio ambiente.

As primeiras tentativas de produção de filmes nanoestruturados com moléculas orgânicas foram feitas ainda no começo do século XX por Irving Langmuir² e mais tarde por Katherine Blodgett³, o que levou ao nome de técnica de Langmuir-Blodgett (LB). As monocamadas de Langmuir são excelente modelo para estudar interações de arranjos bi-dimensionais de moléculas anfífilas e servem como modelos de biomembranas⁴. Um filme de Langmuir mimetiza meia membrana celular, sendo útil na simulação de processos nas membranas, principalmente porque é possível variar condições como concentração enzimática, pressão de superfície e composição da

monocamada. A transferência das monocamadas de Langmuir para suportes sólidos, cujos filmes recebem o nome de Langmuir-Blodgett, oferece a possibilidade de preparar camadas ultrafinas apropriadas para a imobilização de proteínas e enzimas, por exemplo, em matrizes de adsorção como os fosfolipídios, e estudá-las no estado sólido.

Nanoestruturas proteolipídicas na forma de filmes Langmuir-Blodgett podem ser usadas em dispositivos eletrônicos, como em biossensores, cuja estrutura é baseada em nanoestruturas inteligentes¹. Contudo, é necessário primeiramente um estudo detalhado de cada sistema biomimético para compreensão da funcionalidade da estrutura. As monocamadas de Langmuir fornecem dados importantes quanto à morfologia, elasticidade e adsorção, complementando resultados de filmes Langmuir-Blodgett.

A automontagem por adsorção física, ou *layer-by-layer* (LbL), é outro método de obtenção de filmes nanoestruturados para diversas funções, dentre elas a de biossensores. É uma técnica mais simples, e complementar à de Langmuir-Blodgett. Apresenta a vantagem de ser mais propícia a aplicações, mas tem a desvantagem de fornecer menor controle da organização molecular. Assim, para um dado sistema sob estudo, o ideal é empregar as duas técnicas para verificar qual é a mais apropriada para o caso em análise.

Neste trabalho de mestrado, realizou-se um estudo com a enzima peroxidase de raiz forte, que catalisa reações de peróxido de hidrogênio, para a aplicação em biossensores de peróxido. Primeiramente, um estudo fundamental de monocamadas de Langmuir de lipídios e mistos com proteínas foi necessário, caracterizando-as quanto ao grau de empacotamento, concentração de solução, conformação, adsorção, pressão de superfície e elasticidade. Também foram produzidos filmes Langmuir-Blodgett do sistema lipídio-proteína, que foram caracterizados quanto ao grau de transferência, morfologia e atividade enzimática. Além disso, filmes automontados de um sistema similar, polissacarídeo-proteína, foram caracterizados levando-se em conta o grau de

adsorção, morfologia e atividade enzimática. Por fim, uma comparação entre biossensores obtidos pelas diferentes técnicas foi traçada, o que permitiu determinar qual método de formação de nanoestruturas leva a melhores resultados quanto à preservação da atividade enzimática.

A dissertação está organizada da seguinte forma: no Capítulo 2 são descritos os materiais e métodos de fabricação de filmes e caracterização empregados nas pesquisas. Os procedimentos experimentais específicos para o trabalho de mestrado são apresentados no Capítulo 3 e os Capítulos 4 e 5 trazem os resultados e discussão para filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB), respectivamente. Os resultados obtidos com filmes automontados são discutidos no Capítulo 6, e o Capítulo 7 fecha a dissertação com as conclusões gerais e perspectivas de trabalhos futuros.

1.1. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal estudar a interação da enzima peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*, HRP) em interfaces nanoestruturadas como monocamadas de Langmuir, filmes Langmuir-Blodgett e filmes automontados por adsorção física, para testes como biossensor de peróxido de hidrogênio. As metas específicas compreenderam:

- Estudo de filmes de Langmuir como modelo de membrana, inicialmente com fosfolípido puro e depois filmes mistos com fosfolípido e enzima;
- Transferência de monocamadas para substratos sólidos, formando filmes Langmuir-Blodgett (LB), tanto de fosfolípido puro quanto misto com a enzima;

- Fabricação de filmes automontados, com camadas da enzima alternadas com camadas de quitosana;
- Comparação da atividade catalítica da enzima, imobilizada em filmes LB e automontados, com vistas à aplicação de biossensores para peróxido de hidrogênio.

Capítulo 2

2. Materiais e métodos

2.1. Ácidos graxos

Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos (geralmente de 14, 16 ou 18 átomos de carbono) que apresentam o grupo carboxila ($-\text{COOH}$) ligado a um radical alquila de cadeia saturada ou insaturada. Os ácidos graxos possuem reações semelhantes aos demais ácidos carboxílicos: reagem com bases formando sais orgânicos e reagem com álcoois produzindo ésteres. Os ácidos graxos insaturados são mais comumente encontrados na gordura vegetal, enquanto os saturados são mais encontrados em gordura animal. Compõem materiais elaborados pelos organismos, denominados lipídios. São moléculas anfifílicas, ou seja, possuem ao longo de sua cadeia duas partes distintas: uma parte polar, solúvel em água, também chamada de cabeça hidrofílica e outra parte apolar, insolúvel em água, em geral uma cauda hidrofóbica. Um exemplo de ácido graxo está ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Representação do ácido esteárico.

2.2. Fosfolipídios

Os fosfolipídios são ésteres do glicerofosfato - um derivado fosfórico do glicerol. A um dos oxigênios do fosfato podem estar ligados grupos neutros ou carregados, como a colina, a etanoamina, o inositol, glicerol ou outros. As fosfatidilcolinas, por exemplo, são chamadas de lecitinas. Os fosfolipídios ocorrem em praticamente todos os seres vivos, sendo o componente estrutural de maior abundância nas membranas biológicas. Como são anfífilos, também são capazes de formar pseudomicrofases em solução aquosa; a organização, entretanto, difere das micelas⁵. Os fosfolipídios se ordenam em bicamadas, formando vesículas. Estas estruturas são importantes para conter substâncias hidrossolúveis em um sistema aquoso - como em membranas celulares ou vesículas sinápticas. Mais de 40% das membranas das células do fígado, por exemplo, são compostos por fosfolipídios. Envolvidos nestas bicamadas encontram-se outros compostos, como proteínas, açúcares e colesterol. Um exemplo de fosfolipídio está ilustrado na Figura 2.

Figura 2: Exemplo de um fosfolipídio, no caso, DPPG.

Os fosfolípidios têm sido continuamente estudados nas últimas décadas em estudos de membranas. Do ponto de vista físico-químico, a habilidade de formação de estruturas como monocamadas numa interface é particularmente interessante, já que permite estudo aprofundado de suas características conformacionais, bem como elaboração de sistemas biomiméticos.

2.3. Peroxidase de raiz forte

As peroxidases^{6,7} são enzimas oxirredutases (catalisam reações de óxido-redução) que oxidam substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogênio como molécula aceitadora de elétrons. A reação é descrita pela equação:

$X_{\text{oxidada}} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{(peroxidase + cofator)}} X_{\text{reduzida}} + \text{H}_2\text{O}_2$ em que X é a molécula que sofre peroxidação.

Estruturalmente, as peroxidases podem ser divididas em quatro classes: peroxidases bacterianas, peroxidases de origem animal, peroxidases fúngicas e peroxidases de plantas. As peroxidases podem também ser divididas quanto à presença de um grupo heme, ou seja, podem ser classificadas como hêmicas ou não-hêmicas. As peroxidases hêmicas catalisam reações de hidrólise usando o íon de ferro⁸ do grupo heme. As peroxidases não-hêmicas, também conhecidas como peroxirredoxinas, usam cisteínas com atividade redox no seu centro ativo. As peroxidases têm papel importante na desintoxicação celular ao eliminar o peróxido de hidrogênio. Os substratos das peroxidases são de natureza diversa, incluindo-se proteínas, lipídios, fosfolipídios, ácidos graxos e polissacarídeos.

O grupo heme nas peroxidases hêmicas tem o íon de ferro no estado de oxidação Fe(III) entre ciclos catalíticos. Uma molécula de peróxido oxida este íon, formando a espécie $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$, com alta capacidade oxidante, reduzindo-se quando oxida o substrato orgânico da peroxidase. No fim do ciclo catalítico⁹, o ferro volta ao estado de oxidação Fe^{3+} . As peroxidases não-hêmicas possuem uma cisteína no centro ativo, que é oxidada por uma molécula de peróxido de hidrogênio, a “S”-hidroxicisteína. Esta cisteína forma então uma ligação dissulfureto com a

cadeia lateral de outra cisteína da peroxirredoxina. Tal ligação química constitui uma forma oxidada das cisteínas e sua redução química é feita por um substrato orgânico.

A peroxidase de raiz forte, mostrada na Figura 3, é uma hemo-enzima extraída da *Amoracia Rusticana*, uma raiz de plantas cultivadas em regiões temperadas com grande valor na culinária como molho ou tempero. A produção da HRP ocorre relativamente em larga escala por causa de sua vasta gama de aplicações comerciais. Destacam-se a biodegradação de efluentes na indústria de papel e celulose, compostos fenólicos¹⁰ e detecção de peróxidos, oxidação de toxinas devido ao peróxido e biossensores¹¹ de peróxido de hidrogênio, entre outras aplicações clínicas e biomédicas^{12,13}. A massa molecular da HRP é 44 000 Da, incluindo a cadeia polipeptídica (33 890 Da), um grupo heme oxidado mais Ca^{2+} (aproximadamente 700 Da), e uma cadeia polissacarídica (9 400 Da). Devido à catálise para formação de peróxido de hidrogênio, essa enzima promove oxidação de muitos doadores de hidrogênio cromogênicos. O pH ótimo varia na faixa de 6,0 a 6,5; sendo estável na faixa de pH entre 5,0 e 9,0¹⁴.

Figura 3: Representação estrutural em três dimensões da peroxidase de raiz forte (HRP).

Embora a HRP venha sendo empregada em biossensores¹⁵, estudos básicos¹⁶ sobre adsorção em filmes nanoestruturados, como monocamadas de Langmuir e filmes LB, são ainda

raros na literatura. Assim, o estudo realizado neste projeto foi importante para compreender mecanismos de adsorção enzimática em matrizes, bem como o funcionamento de biossensores.

2.4. Quitosana

A quitosana^{17,18} é um polissacarídeo obtido da quitina de carapaças de crustáceos. A quitina é separada de outros componentes da carapaça por um processo químico que envolve desmineralização e desproteinização das carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico, por exemplo¹⁹. A quitina com grupos acetil (NHCOCH_3) é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo a quitosana. Esta possui estrutura molecular similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. Grupos hidroxil (OH) estão dispostos na estrutura geral do carboidrato para a celulose e grupos amino (NH_2) para a quitosana (Figura 4). É solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação (adição de prótons) do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades diferenciadas em relação às fibras vegetais. Devido à alta densidade de cargas positivas do polímero, a quitosana atrai e se liga aos lipídios, porém esse processo ainda não é totalmente compreendido²⁰. No nosso caso, a imobilização da HRP em matrizes de quitosana²¹ foi investigada para comparar os níveis de atividade do sensor como também a morfologia do sistema quanto à sua funcionalidade.

Figura 4: Estrutura molecular da quitosana.

2.5. Filmes nanoestruturados

2.5.1. Filmes de Langmuir

Filmes de Langmuir são obtidos através da dissolução de substâncias anfifílicas, ou seja, que apresentam partes hidrofóbicas e hidrofílicas em sua cadeia molecular, em um solvente apolar, volátil, seguida de seu espalhamento sobre a superfície de uma subfase²². São produzidos numa cuba, usualmente de forma retangular e feita de um material hidrofóbico, como o Teflon (poli(tetrafluoretileno)), que contém a subfase aquosa. Para que o filme seja tão fino a ponto de se atingir a espessura de uma molécula, esta área superficial deve ser suficientemente extensa e/ou a quantidade de material espalhado suficientemente pequena. A solução é espalhada sobre toda a superfície e o solvente evapora em poucos minutos. Se a área disponível por molécula for suficiente, o filme se encontra no estado denominado gasoso, onde as interações entre as moléculas do anfifílico são fracas. Se a área superficial para o filme for diminuída, através da compressão do filme com uma ou duas barreiras móveis, as moléculas interagirão progressivamente à medida que a área média ocupada por molécula diminuir. Ao longo da compressão, as moléculas vão se rearranjando de tal forma que podemos fazer analogia aos três estados da matéria: gasoso, líquido (expandido e condensado) e sólido²³. As mudanças de fase

podem ser identificadas por monitoramento da pressão de superfície em função da área ocupada por molécula na cuba, que indicam o grau de empacotamento das moléculas na interface ar/água. O chamado estado gasoso indica o estado de menos organização das moléculas, e o líquido-condensado o estágio de maior organização das moléculas na interface, como mostra a Figura 5.

Figura 5: Representação de uma cuba de Langmuir em funcionamento.

Na fase líquido-condensada o filme pode ser transferido para um suporte sólido, imergindo e emergindo o suporte perpendicularmente à superfície do filme de Langmuir. Podem ser feitas várias imersões e emersões consecutivas, assim, um filme com multicamadas pode ser formado. O filme obtido é conhecido como filme Langmuir-Blodgett (LB).

2.5.2. Filmes Langmuir-Blodgett

O método de Langmuir-Blodgett foi concebido várias décadas atrás por Irving Langmuir e Katharine Blodgett²⁴, seguindo desenvolvimentos em química de superfície que datam do início do século XX. A idéia inicial era de usar anfífilicos, mas essa técnica se estendeu consideravelmente a uma variedade de substâncias, incluindo polímeros²⁵ e outras

macromoléculas. Para fabricar um filme LB, comprime-se inicialmente o filme de Langmuir até que ele atinja um grau de compactação razoável (usualmente uma pressão de superfície acima de 20mN/m). O suporte sólido é então imerso verticalmente na subfase aquosa, de forma que, ao passar pela interface ar/água, uma camada do filme de Langmuir seja transferida para o suporte, como mostra a Figura 6. Se o filme for emerso da subfase, uma segunda camada será transferida. Assim, o número de camadas e, conseqüentemente, a espessura do filme serão controlados pelo número de imersões e emersões do filme pela interface. Em variações desse procedimento, pode-se iniciar a deposição pela emersão do suporte sólido, se esse for hidrofílico, uma vez que a interação monocamada-suporte será via cabeça polar do anfifílico. Assim, há três diferentes tipos de filmes, dependendo da seqüência de imersões e emersões (vide Figura 6).

Figura 6: Representação esquemática da deposição de um filme LB e seus diferentes tipos de deposição, na seqüência: X, Y e Z.

Quando a monocamada transferida for formada por um lipídio (um fosfolipídio, por exemplo), podemos formar uma bicamada através de uma emersão seguida por uma imersão. Se esse suporte, com duas camadas de lipídio, for imerso numa solução contendo uma proteína de membrana, tal proteína poderá, por adsorção física, ser imobilizada no filme, e assim teremos um modelo simplificado para uma membrana biológica e suas propriedades estudadas por várias técnicas. A primeira caracterização quando se transfere uma monocamada de Langmuir a um suporte sólido na forma de filme LB é o cálculo da razão de transferência. Antes da imersão ou

emersão do suporte, a barreira móvel deve estar parada e a pressão de superfície constante. Quando a placa passa verticalmente pela monocamada, se houver transferência do filme na interface ar/água para a interface sólido/água ou sólido/ar, a pressão de superfície sofrerá um decréscimo devido à retirada de material da superfície aquosa. A barreira então é acionada para comprimir a interface e restaurar a pressão de superfície inicial. O decréscimo da área ocupada pela monocamada na superfície da água (ΔC) deve ser igual à área do suporte sólido que passou verticalmente pela monocamada em contato com ela (ΔS)²⁰.

Assim, a razão de transferência (RT) pode ser calculada como:

$$RT = \Delta C / \Delta S \quad (1)$$

Quanto mais próximo da unidade for o valor da razão calculada, mais perto a idealidade de transferência.

2.5.3. Filmes automontados

A técnica de automontagem por adsorção física ou *self-assembly* ou *layer-by-layer* (LbL) foi concebida em sua primeira forma na década de 1990 por Decher et al.²⁶ em que a adsorção física ocorre devido à atração iônica²⁷. O método se baseia na adsorção num substrato sólido de espécies de cargas contrárias, a partir de soluções aquosas. A adsorção espontânea é causada por atração eletrostática das camadas, ou mesmo por interações secundárias, como as ligações de hidrogênio²⁸. Vários tipos de substratos podem ser utilizados, como o vidro, quartzo, silício, membranas ou até mesmo partículas micrométricas. O substrato pode ser quimicamente tratado para ter sua superfície carregada, e posteriormente imersa em uma solução contendo cargas

opostas (poliânions ou policátions). O sistema substrato/filme é então lavado em solução aquosa de pH igual à solução polimérica para retirar o excesso de material adsorvido, sendo posteriormente imerso em solução com material com cadeias de sinal oposto à da primeira imersão. A repetição deste processo permite a obtenção controlada de multicamadas, como ilustrado na Figura 7.

Figura 7: Ilustração esquemática de preparação de filmes automontados.

2.6. Técnicas de caracterização

2.6.1. Pressão de superfície

A pressão de superfície (π) de um filme de Langmuir é definida como a diferença em tensão superficial entre uma subfase na ausência do material (γ_0) e uma subfase com a monocamada (γ), como representado na Equação 2:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2)$$

A tensão superficial pode ser medida pelo método de Wilhelmy, no qual um sensor (usualmente uma placa de material hidrofílico) é colocado de forma a interceptar a interface ar/água. Esse sensor é suspenso a um braço conectado a uma balança, e a força resultante no sensor é diretamente proporcional à tensão superficial. Com a compressão da interface através de uma ou duas barreiras móveis, a área disponível por tensoativo é diminuída, e a pressão superficial passa a aumentar com a compressão. Quando a monocamada é comprimida na superfície da água, ela passa por diversas transformações de fase. A mudança de fase pode ser descrita através de uma curva característica de pressão – área e os estados superficiais da monocamada podem ser analisados a partir do perfil da curva, como vemos na Figura 8. No estado gasoso, as moléculas estão mais dispersas na monocamada, na líquido-expandida as moléculas começam a interagir entre si e na líquido-condensada, as moléculas encontram-se altamente organizadas e compactadas na interface. O colapso indica que a monocamada atingiu uma pressão mais alta do que poderia suportar mantendo sua organização. Deste ponto em diante a monocamada se desestrutura.

Figura 8: Perfil de uma isoterma para ácido esteárico com os três estados análogos à matéria.

2.6.2. Fator de compressibilidade

Além de informações inerentes ao empacotamento das cadeias na monocamada, podemos obter outras informações a partir da isoterma de superfície. Por exemplo, o fator de compressibilidade (C_s^{-1}), definido por $-1/A(\partial\pi/\partial A)$, também conhecido como elasticidade superficial de equilíbrio ou módulo compressional. Essa relação é proporcional à inclinação da curva π - A , ou seja, quanto maior o aumento da pressão de superfície devido a uma compressão, menor será a compressibilidade (ou maior a elasticidade) do filme. Desta forma, é possível determinar quão susceptível à compressão é uma monocamada. Analisando o perfil de uma isoterma, é possível identificar várias “regiões de compressibilidade”. Notam-se três estágios de compressibilidades, relacionados a diferentes estados físicos, atribuídos de forma análoga aos estados tridimensionais da matéria. Regiões com pressão superficial constante, mesmo com constante redução da área disponível por molécula, são atribuídas às transições de fases. A

extrapolação da região com a menor compressibilidade para pressões de superfície igual a zero é conhecida como área mínima ou área limitante e a pressão máxima atingida, como já citamos, é conhecida como pressão de colapso, onde a estrutura em monocamada é desfeita e bicamadas ou multicamadas são formadas desorganizadamente.

2.6.3. Potencial de superfície

O potencial de superfície (ΔV) é a diferença de potencial entre a superfície e a subfase da cuba, com a interface com o tensoativo (ΔV_{II}), subtraída a diferença de potencial entre a superfície e a subfase, com a interface sem o tensoativo (ΔV_I), ou seja, $\Delta V = \Delta V_{II} - \Delta V_I$. A interface ar/água é naturalmente polarizada devido à orientação espontânea das moléculas de água nas proximidades da interface, com os átomos de oxigênio voltados em direção ao ar, originando uma diferença de potencial através da interface. Essa diferença de potencial é alterada com a presença da monocamada, e depende da componente normal à interface do momento de dipolo médio das moléculas do filme, e também da reorientação e polarização das moléculas da subfase próximas à interface. O potencial de superfície pode ser medido pelo método do capacitor vibrante²⁹, no qual a interface funciona como um capacitor de placas paralelas, com a monocamada sendo uma dessas placas e uma segunda colocada paralelamente a poucos milímetros acima da superfície. A vibração dessa placa causa variação na capacitância gerando uma corrente elétrica que flui por uma resistência de carga. A voltagem através desse resistor é amplificada e medida por um detector. Ajusta-se o sistema para obter uma corrente nula, e então o campo elétrico entre as placas (subfase e placa metálica) se anula, indicando que o potencial na placa metálica é o mesmo da subfase. Toma-se como zero o potencial da subfase, que só se altera

quando a monocamada é comprimida além de uma área crítica, como será discutido no Capítulo de resultados. A Figura 9 ilustra um caso em que o potencial, mesmo para grandes áreas por molécula, é negativo, devido à contribuição da dupla camada elétrica, como também será discutido mais tarde. No gráfico, a área crítica para o aumento do potencial é marcada³⁰.

Figura 9: Perfil de uma curva de potencial de superfície para DPPG.

2.6.4. Elasticidade dinâmica

Medidas de elasticidade dinâmica³¹, obtidas com o método da gota pendente, são utilizadas para medir a tensão superficial dinâmica e a elasticidade superficial dinâmica de uma monocamada de Langmuir na superfície de uma gota. Esta gota, mostrada na Figura 10, fica pendente na extremidade de uma seringa suspensa dentro de uma cubeta de vidro óptico,

termostatizada, contendo água para evitar sua evaporação. A imagem da gota é capturada por uma câmera de vídeo acoplada a um sistema de aquisição de dados, como mostra a Figura 11. A tensão superficial é determinada então digitalizando-se a imagem da gota e adequando os valores do formato da gota pela equação de Young-Laplace³²:

$$\Delta P = (\rho_d - \rho_l)gh = (\gamma/R_1) + (\gamma/R_2) \quad (3)$$

onde ΔP é a diferença de pressão na interface, $\rho_d - \rho_l$ são as densidades das fases mais densa e menos densa respectivamente, g é a aceleração da gravidade, h é a altura da coluna líquida na gota, e $R_1 + R_2$ os dois principais raios de curvatura da gota, sendo que para R_1 o raio é de uma circunferência e R_2 para uma elipsóide.

Figura 10: Imagem de uma gota pendente.

As medidas de elasticidade começam assim que a tensão superficial torna-se estável, para evitar mudanças drásticas na tensão superficial durante os experimentos após a formação da gota. As imagens são registradas com a videocâmera a um mínimo de 200 fotos por segundo e um gerador de função produz o movimento senoidal da gota numa frequência especificada. Ao final do experimento, o programa retorna as imagens gravadas e calcula as alterações na área e as

respectivas mudanças na tensão superficial para cada ciclo. Usando uma transformada de Fourier, a elasticidade e o atraso de fase entre a área e a tensão superficial são determinados.

Figura 11: Equipamento utilizado no método da gota pendente.

2.6.5. Microbalança a cristal de quartzo

Uma microbalança a cristal de quartzo (MCQ)³³ consiste em um fino disco de quartzo, com filmes metálicos depositados em ambas as faces, que servem como eletrodos, conectados a um freqüencímetro. A freqüência fundamental do cristal depende de sua estrutura química, de sua espessura, formato e massa. A deposição de um material sobre esse cristal causa uma variação na freqüência de ressonância, que é em muitos casos proporcional à massa adsorvida, segundo a equação de Sauerbrey³⁴:

$$\Delta m = - \Delta f A_c (2,26 \cdot 10^6 F_o^2)^{-1} \quad (4)$$

onde Δm é a massa depositada sobre o cristal em nanogramas; Δf é a variação de frequência em Hz; A_c é a área efetiva do cristal (ou seja, a área compreendida entre os eletrodos) e F_o é a frequência inicial do cristal em MHz.

Figura 12: Em a): vista superior e inferior de um cristal de quartzo com ouro (Au) depositado; b): célula para cristal piezoelectrico com frequencímetro e sistema oscilador; c): gráfico que representa a relação entre frequência de oscilação do quartzo em função do tempo. *Figura retirada de DAMOS, F.S., Mendes, R.K., Kubota, L.T., Quím. Nova, 27, 6, 970-979, 2004.*

A massa depositada em filmes LB, na ordem de nanogramas, pode ser estimada via MCQ³⁵. Esta técnica tem sido usada para determinar não somente a massa depositada por camada em filmes LB^{36,37}, como também a massa adsorvida de proteínas e outras macromoléculas, a partir de solução, em filmes LB pré-preparados³⁸.

2.6.6. PM-IRRAS

O método de espectroscopia infravermelha por reflexão e absorção (IRRAS) serve para avaliar a composição química e a orientação das moléculas na interface ar-água. Tem a vantagem de a luz perpendicularmente (p) polarizada ser preferencialmente absorvida na reflexão, enquanto a luz paralelamente (s) polarizada não é absorvida. Em contrapartida, a absorção em meios isotrópicos é independente da polarização; portanto, qualquer diferença entre os sinais da luz paralela e da perpendicularmente polarizada pode ser atribuída à absorção específica da superfície. Além disso, o espectro de absorção do vapor de água interfere nos resultados entre 1400 e 1800 cm^{-1} . A modulação por polarização (PM) pode ser usada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho, onde a luz incidente é continuamente modulada entre s e p polarizada a altas frequências. Isso permite a medida simultânea de modo eficiente do espectro das duas polarizações. A diferença fornece a informação específica de superfície e a soma fornece o espectro de referência, além de minimizar o efeito da água^{39,40}.

A diferença entre os sinais adsorvidos e refletidos pode ser expressa da seguinte maneira⁴¹:

$$\Delta R/R = (I_p - I_s)/(I_p + I_s) \quad (5)$$

Onde I_p é a intensidade da radiação p-polarizada e I_s da componente s-polarizada.

Figura 13: Ilustração esquemática da radiação p- e s-polarizada.

Somente a radiação p-polarizada interage com a superfície da amostra, como mostra a Figura 13. Conseqüentemente, as vibrações ativas que podem ser detectadas em IRRAS devem ter um componente do dipolo polarizado no sentido normal à superfície da amostra. Estes resultados mostram uma regra de seleção da superfície para PM-IRRAS⁴², que é usada para estudar a orientação molecular da monocamada depositada em interfaces líquidas ou sólidas.

2.6.7. Espectroscopia de fluorescência

Com a espectroscopia de fluorescência, obtém-se o espectro da radiação emitida por um átomo ou molécula, quando esta relaxa do estado excitado para o fundamental. O instrumento utilizado é um espectrofluorímetro (Figura 14) que contém uma fonte de excitação que emite de modo contínuo, por isso denominado foto-estacionário.

Figura 14: Ilustração esquemática do funcionamento de um fluorímetro.

O estado excitado deverá, para que a emissão seja uma fluorescência, apresentar a mesma multiplicidade do estado fundamental. Dois tipos totalmente distintos de espectros podem ser obtidos através desse instrumento: o espectro de fluorescência e o de excitação. No espectro de fluorescência, costuma-se escolher como comprimento de onda para a excitação aquele em que a amostra absorver com maior intensidade no seu espectro de absorção, mantendo-se fixo este comprimento ao se registrar os comprimentos de onda e as intensidades das emissões. No espectro de excitação, pode-se apenas registrar emissões que ocorram num comprimento de onda fixo geralmente aquele em que a amostra emitir com maior intensidade, enquanto varia-se o comprimento de onda de excitação sobre toda a faixa do seu espectro de absorção.

Embora em ambos os casos o registro seja o de emissões por fluorescência, convencionou-se chamar espectro de fluorescência apenas ao primeiro, denominando-se espectro de excitação ao segundo. Este deve, portanto, apresentar picos nos mesmos comprimentos de onda do espectro de absorção e, além disto, ter forma semelhante a este último. Note-se que, ao contrário do que

geralmente ocorre, no espectro de excitação a intensidade e o comprimento de onda não se referem à mesma radiação (a primeira refere-se à radiação emitida pela amostra, enquanto que o segundo à absorvida).

Capítulo 3

3. Procedimentos experimentais

Todas as medidas e caracterizações dos filmes nanoestruturados e da enzima em solução foram feitas à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e com água purificada pelo sistema Milli-Q® (resistividade de 18,2 MΩcm). Sais e solventes utilizados na preparação de soluções foram da mais alta pureza disponível no mercado. Tanto para os filmes de Langmuir quanto para os filmes de Langmuir Blodgett, os experimentos foram realizados numa sala limpa de classe 10000.

A limpeza dos substratos de vidro e de quartzo foi feita seguindo o método de hidrofilição⁴³, baseado na oxidação e dissolução de impurezas orgânicas e contaminantes metálicos. Neste método os substratos são imersos em uma solução 1:1:5 (em volume) de hidróxido de amônio (NH₄OH) 28%, de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% e de água purificada pelo sistema Milli-Q®, respectivamente. Em seguida a solução é aquecida a 75°C, permanecendo nessa temperatura por 10 minutos aproximadamente, quando as lâminas são retiradas e lavadas com água em abundância. Na segunda etapa de limpeza, uma solução 1:1:6 (em volume) de ácido clorídrico (HCl) a 37%, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e água ultrapura, respectivamente é aquecida a 75°C, quando as lâminas são imersas e deixadas por mais 10 minutos aproximadamente. Por fim, as lâminas são lavadas com água ultrapura em abundância e secas com nitrogênio.

Para as monocamadas de Langmuir, diversos métodos de formação de monocamadas mistas enzima (HRP – da Sigma)/fosfolipídio (DPPG – da Sigma), foram usados. Também foi utilizado ácido esteárico (Sigma) para treinamento. Em todos os métodos, a quantidade final de

material foi regulada para ter uma massa total de 40 μg de HRP e de 75 μg de DPPG, levando a uma proporção em mol de 99:1 fosfolipídio:enzima, que é a recomendada na literatura⁴⁴ para a mimetização de membranas celulares. A cuba utilizada foi da marca Nima (modelo 601M). A pressão de superfície foi medida através do método de Wilhelmy, com uma placa retangular de papel de filtro. A compressão da interface ar/água foi feita através de duas barreiras móveis com a velocidade de 30 cm^2/min , com a pressão de superfície registrada simultaneamente em função da diminuição da área molecular de DPPG, obtendo-se isothermas de pressão de superfície-área (isothermas π -A).

Vários métodos de mistura (ou de coespalhamento) enzima-lipídio na interface ar/água foram testados. No primeiro deles, chamado aqui de **formação de subfase**, foi preparada uma solução de HRP na concentração de $8.10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,05 \text{ g L}^{-1}$) e NaCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, com pH final igual a 6,21, valor considerado dentro da faixa ótima para a enzima^{6,44}. Essa solução foi usada para preencher a cuba de Langmuir e, portanto, usada como subfase suporte para a monocamada. Posteriormente, espalhou-se solução de DPPG (dissolvido em clorofórmio: metanol, na proporção em volume de 3:1 respectivamente). Para o método de coespalhamento chamado aqui de **conjunto**, uma solução de DPPG e enzima foi preparada em clorofórmio, metanol e água (2:1:0,3 em volume) e espalhada na interface em solução tampão (a mesma descrita no item anterior). No método chamado de **injeção**, a solução de enzima foi injetada após formação da monocamada lipídica, a poucos milímetros da superfície. E no método **em separado**, a solução de enzima foi espalhada na superfície após o espalhamento do DPPG.

A caracterização das monocamadas por pressão-área variando-se a concentração enzimática foi realizada com soluções de 0,4, 0,6 e 0,8 g.L^{-1} de HRP em solução tampão pH 6 e 0,85 g.L^{-1} para a solução fosfolipídica diluída em clorofórmio. Para estudar as propriedades

reológicas e a cinética de adsorção da HRP à interface ar/água, utilizou-se o método da gota pendente, com análise da tensão superficial pelo seu formato axissimétrico com um tensiômetro acoplado a uma videocâmera (Dataphysics). As concentrações das soluções usadas foram de $0,06 \text{ g L}^{-1}$ para a enzima e $0,05 \text{ g L}^{-1}$ para o fosfolipídio. Para isso uma gota de aproximadamente $40 \mu\text{L}$ da solução de enzima foi formada. O tempo de espera para a estabilização da tensão superficial da gota após a inserção da enzima foi de aproximadamente 7 minutos e, após o espalhamento do fosfolipídio, de 10 minutos. O lipídio foi espalhado sobre a superfície da gota e após estabilização da tensão superficial, a gota foi sujeita a uma oscilação periódica a uma frequência de 1 Hz e amplitude de 0.1 mm. Após oscilação, foi determinada a elasticidade dinâmica da superfície da gota através da relação tensão superficial-deformação.

Uma cuba da *KSV Instruments* foi utilizada para a deposição dos filmes Langmuir-Blodgett. As soluções utilizadas foram de DPPG a $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ e HRP a $0,6 \text{ g.L}^{-1}$. A deposição dos filmes LB foi feita em suportes sólidos de quartzo hidrofílicos, sobre os quais depositamos uma camada. A subfase era constituída de solução de NaCl 0,1 M e de solução tampão fosfato pH 6. O valor da pressão de superfície para a deposição foi de 30 mN/m , a velocidade das barreiras móveis de $10 \text{ mm}^2/\text{min}$ e o tipo de co-espalhamento escolhido foi o de coinjeção. O volume espalhado tanto de DPPG quanto de HRP respeitou a relação 99:1, seguindo um exemplo prévio na literatura¹³.

Para as medidas de microgravimetria a cristal de quartzo, a deposição do filme LB de DPPG/HRP foi feita sobre um cristal de quartzo próprio para esse tipo de medida, na qual foi inferida a sua frequência antes e depois do filme depositado.

A atividade superficial foi estudada numa cuba da marca Kibron a pressões iniciais de 10 e 20 mN/m . Foram depositados $2 \mu\text{L}$ e $1 \mu\text{L}$ da solução de DPPG a $0,65 \text{ g.L}^{-1}$ até se atingir a

pressão de 10 mN/m e 20 mN/m, respectivamente. Após essa etapa, injetamos 1 μL de solução de HRP na subfase e monitoramos a cinética de adsorção da enzima na monocamada fosfolipídica.

As medidas de potencial de superfície foram realizadas numa cuba da *KSV Instruments* modelo 5000. Foram depositados 100 μL da solução de DPPG a 0,6 g.L^{-1} e então obtida a curva de potencial para esse sistema.

As medidas de PM-IRRAS foram feitas na Finlândia, sede da *KSV Instruments* pelo Dr. Luciano Caseli, colaborador neste projeto. O equipamento utilizado foi o PMI550 da KSV, com resolução espectral de 8 cm^{-1} e ajuste de ângulo de incidência entre 40° e 80°. Utilizamos uma solução de DPPG entre 0,5 a 1,0 g.L^{-1} em clorofórmio:methanol a uma proporção de 4:1 em volume. Essa solução foi espalhada em uma cuba da KSV de volume de 220 mL contendo tampão fosfato e NaCl para aumentar a força iônica. Para as monocamadas mistas respeitamos a proporção de 99:1 de fosfolipídio e enzima na cuba. Após espalhamento de DPPG na interface ar-água, HRP foi injetado na subfase aquosa na mesma proporção usada nos experimentos de pressão-área. Periodicamente, espectros de PM-IRRAS foram coletados num intervalo de 10 minutos, o que gerou num espectro final, resultado de uma média de 6000 espectros. Pudemos extrair então espectros de PM-IRRAS em função do tempo. A monocamada mista era comprimida até uma pressão desejada, e a barreira mantida constante, até que novos espectros eram obtidos. Para comparação, espectros com a enzima adsorvendo na interface ar-água sem lipídios também foram medidos. O ângulo de incidência de todas as medidas foi de 80°. Para filmes LB, foi transferida uma monocamada mista de DPPG-HRP para um suporte sólido e tirado o espectro de PM-IRRAS diretamente sobre a amostra.

A atividade enzimática para filmes LB de DPPG/HRP foi monitorada através de medidas de espectroscopia UV-vis da amostra em meio reacional de pirogalol e H_2O_2 , com concentrações de 12,8 mM e 0,5 mM, respectivamente⁴⁵. A reação será descrita na seção de resultados para

atividade enzimática. Um intervalo de tempo de 5 minutos foi respeitado a cada medida, seguindo as limitações do aparelho. Da mesma forma, a atividade enzimática em meio homogêneo foi monitorada utilizando-se do mesmo equipamento e de procedimento similar, sendo que ao invés do filme LB de DPPG/HRP foi acrescentada ao meio reacional a solução de HRP em tampão fosfato pH=6.

Imagens de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia óptica foram obtidas para filmes LB de DPPG com peroxidase e em filmes automontados da enzima com quitosana. Utilizamos diversas amostras de filmes LB e automontados, antes e após medidas de atividade enzimática para verificar se a estrutura do biossensor para ambas as técnicas de fabricação se mantém após contato com o meio reacional.

Para a deposição de filmes automontados (LbL), usamos dois tipos de suportes sólidos, dependendo da técnica de caracterização: cristais de quartzo (SRS) com frequência inicial de 5MHz para microbalança a cristal de quartzo (SRS); e quartzo para espectroscopia na região do ultravioleta visível e de fluorescência (Hitachi U 2001). Os suportes foram alternadamente imersos numa solução de quitosana ($1,2 \text{ g L}^{-1}$) em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e NaCl $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (pH entre 3 e 4), e numa solução de HRP ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) em tampão fosfato (pH entre 6 e 7). Entre os mergulhos, o suporte era imerso por poucos segundos em solução de lavagem (mesma força iônica e pH, mas sem o material de adsorção). Foram crescidas sete bicamadas, sendo alternadamente uma de quitosana e uma de peroxidase de raiz forte. O tempo de adsorção da quitosana foi de 10 minutos e o tempo de adsorção da enzima variou conforme os resultados obtidos pela QCM que oscilaram entre 30 e 6 minutos, respectivamente para a primeira e última bicamada. Para observar o crescimento do filme, o substrato era colocado no interior da cubeta com soluções de PSS (poliestireno sulfonado) da Sigma-Aldrich a $1,236 \text{ g L}^{-1}$, H_2O_2 a 5 mmol L^{-1}

e 6 μL de anilina (Mallinckrodt) em 5 mL de água. Este procedimento foi seguido após cada bicamada formada.

As medidas de UV-vis para inferir a atividade enzimática foram realizadas em ausência de luz, pois há substâncias fotossensíveis participando da reação. Foram inseridas soluções de pirogallol (Sigma-Aldrich) a $12,8 \text{ mmol L}^{-1}$ e de peróxido de hidrogênio a 5 mmol L^{-1} nessa sequência nas cubetas de quartzo, que já continham o substrato com o filme LbL.

Para as medidas de fluorescência, tanto em filmes LB como automontados, utilizamos substratos de quartzo e cubetas próprias para essa medida. A região para excitação foi de 280nm e de emissão de 290nm, emissões típicas de proteínas e grupos triptofano.

Capítulo 4

4. Resultados e discussão para monocamadas de Langmuir

A informação primordial a ser obtida era confirmar a interação da enzima peroxidase de raiz forte com a monocamada do fosfolipídio escolhido. Para isso, fizemos medidas de pressão superficial, variamos os métodos de co-espalhamento das soluções na cuba de Langmuir, variamos a concentração enzimática, analisamos o potencial de superfície, a elasticidade dinâmica, a cinética de adsorção, além de obter espectros de infravermelho da monocamada pura e mista.

4.1. Filmes de Langmuir de DPPG

Foram obtidas curvas de pressão de superfície DPPG em água e em solução tampão fosfato, como mostra a Figura 15, para servir de controle, antes da adsorção da enzima. Da figura nota-se que o tampão (Tp) desloca a curva para áreas maiores (expansão da monocamada), pois as espécies do tampão aumentam a repulsão entre as cadeias, provocando expansão e aumento da pressão de transição. Observa-se um patamar na pressão aproximada de 8 mN m^{-1} , refletindo a transição de líquido-expandido para líquido-condensado, não observada para o fosfolipídio em água pura, o que denota a interação dos íons do tampão com os grupos carregados do fosfolipídio. O colapso a uma maior pressão indica maior estabilidade da monocamada.

Figura 15: Isotermas de DPPG com e sem tampão na subfase.

4.2. Interação enzima/fosfolipídio

Num primeiro experimento, uma pequena quantidade de HRP (50 μL de uma solução 0,8 g L^{-1}) foi introduzida na subfase aquosa após espalhamento de DPPG em solução tampão. Da Figura 16, verificamos que a enzima interage com o fosfolipídio, pois o perfil da curva se altera na faixa entre 40 e 55 $\text{\AA}^2$, ou seja, entre o patamar e o estado líquido condensado. Para a monocamada mista, a compressibilidade é maior, pois a enzima na interface interfere no empacotamento das cadeias de DPPG. Além disso, a estabilidade da monocamada diminui, ou seja, o colapso ocorre a uma pressão menor.

Figura 16: Isotermas de DPPG e DPPG/HRP em solução tampão.

As Figuras 17 e 18 mostram mais detalhadamente a interação DPPG/HRP utilizando o fator de compressibilidade (C_s^{-1}), definido por $-1/A(\partial\pi/\partial A)^{46}$, também conhecido como elasticidade superficial de equilíbrio ou módulo compressional. A compressibilidade aumenta inicialmente com a área por molécula, ou pressão de superfície, e depois decresce abruptamente quando a monocamada se torna rígida. O aumento da elasticidade causado pela HRP indica que pequenas quantidades de enzima interferem no empacotamento denso das cadeias fosfolipídicas além de antecipar as alterações das propriedades de superfície da monocamada.

Figura 17: Gráfico do módulo de compressibilidade vs área por molécula para monocamadas de DPPG e DPPG/HRP.

Figura 18: Gráfico do módulo de compressibilidade vs pressão de superfície para as monocamadas lipídicas sem HRP e com HRP.

4.3. Diferentes formas de incorporação de HRP em filmes de DPPG

Confirmada a interação DPPG/HRP, variamos o tipo de coespalhamento para observar possíveis alterações na monocamada com relação à interação lipídio/proteína, e aumentamos a concentração de enzima. A Figura 19 mostra isotermas obtidas de DPPG/HRP a diferentes tipos de coespalhamento: em separado, conjunto, de formação de subfase e de injeção, sendo a curva de base a isoterma somente com o DPPG. A isoterma oriunda do método de coespalhamento conjunto apresentou transição de fase do DPPG com pressão mais elevada (subiu de 8 para 18-23 mN m⁻¹). Ou seja, o fosfolipídio precisou de uma maior energia para a transição de fase de líquido-expandido para líquido-condensado, provavelmente porque a HRP estava conjuntamente com o DPPG na superfície. Isso pode ter levado a maior homogeneização na interface em relação aos demais métodos, para os quais a transição de fase foi totalmente extinta. No entanto, o patamar não está bem definido na transição de fase, com a pressão se elevando consideravelmente durante o processo de transição. Isso reflete a dificuldade de empacotamento lipídico provocada pela enzima. Houve condensação da monocamada a altas pressões, revelando que a enzima ameniza as repulsões eletrostáticas entre as cadeias de fosfolipídios a um alto grau de empacotamento superficial.

A isoterma utilizando o método de coespalhamento por formação de subfase não apresentou mudanças no perfil da curva, porém também houve deslocamento para áreas maiores, devido à presença da enzima ocupando certa área por molécula na interface. Já a curva obtida após 12 horas utilizando o mesmo método apresentou compressão da monocamada, ou seja, para áreas menores, podendo indicar a formação de pequenos agregados de proteína com lipídio devido à proteína estar na subfase na monocamada lipídica e estar mais homogeneizada na monocamada.

Figura 19: Curvas de pressão de superfície a diferentes tipos de coespalhamento de DPPG/HRP.

A curva por coespalhamento à injeção não apresentou alterações significativas do seu perfil com relação à curva de base, porém houve maior expansão da isoterma, deslocada para áreas muito maiores. O mesmo ocorreu após 12 horas de descanso da monocamada. Isso revela que a proteína adsorvida a partir da subfase provocou a formação de agregados, ocupando grandes espaços de área superficial. No método de coespalhamento separado, similarmente ao coespalhamento conjunto, também houve nítida transição de fase entre líquido-expandido e condensado, pois a enzima foi adicionada por cima da monocamada, sendo adsorvida por entre as moléculas fosfolipídicas. No entanto, neste caso se espera menor homogeneização da monocamada.

De todos os métodos utilizados para co-espalhar a solução de DPPG e HRP, concluímos que o melhor método é o de co-injeção, porque há rápida expansão da monocamada mostrando que a enzima mesmo injetada por debaixo da camada fosfolipídica, adsorve rapidamente. Além disso, o perfil da curva é mais tênue, mostrando que não há transições de fase entre líquido-

expandido para líquido-condensado. Esse resultado confirma o melhor método de co-espalhamento sugerido na literatura por Girard-Egrot et al.¹.

A Figura 20 e a Figura 21 mostram a elasticidade superficial de equilíbrio com relação à área por molécula e com relação à pressão superficial obtida para as monocamadas mistas, com coespalhamento pelos diversos métodos, indicando que a enzima altera significativamente as propriedades reológicas da monocamada. O valor máximo de elasticidade é 250-280 mN m^{-1} , exceto para o método em separado, no qual se observa um pico máximo em torno de 400 mN m^{-1} . Esses resultados revelam que mesmo utilizando métodos diferentes de espalhamento o sistema pouco altera sua elasticidade superficial de equilíbrio.

Figura 20: Fator de compressibilidade vs área por molécula para monocamadas lipídicas e lipídicas mais HRP.

Figura 21: Fator de compressibilidade vs pressão de superfície para as monocamadas lipídicas sem HRP e com HRP.

As curvas de pressão de superfície – área a diferentes concentrações enzimáticas foram feitas utilizando soluções dez vezes mais concentradas para melhor visualização e análise, como podemos ver na Figura 22. Utilizamos o método de co-injeção para o espalhamento da enzima, tido como o melhor método pelos resultados anteriores. Constatamos que maiores concentrações enzimáticas expandem a área da monocamada lipídica.

Figura 22: Pressão superficial em filmes de Langmuir de DPPG/HRP para diferentes concentrações enzimáticas.

4.4. Potencial de superfície

Medidas de potencial de superfície de monocamada pura e mista foram obtidas para avaliar se a proteína alterava o perfil da curva para o DPPG. A curva em preto na Figura 23 mostra o potencial para o fosfolípido, que atingiu valor máximo de 300 mV com o tampão pH 6 utilizado e uma área crítica de 65 Å². O potencial negativo de cerca de -100 mV aparece devido à contribuição da dupla camada elétrica, que ocorre por causa das cabeças polares do fosfolípido ionizado⁴⁷. A curva em vermelho, obtida após injetar-se sob a monocamada de fosfolípido 84 µL de solução de HRP a 0,6g.L⁻¹, mostra um potencial máximo de 400 mV. A modificação no potencial causada pela inserção da enzima pode ser atribuída a dois fatores: i) interações de dipolo entre as cabeças polares do fosfolípido e a enzima, afetando a organização do

empacotamento lipídico, com aumento do potencial de superfície. ii) decréscimo na contribuição negativa da dupla camada elétrica ao potencial de superfície. Esta segunda hipótese deve ser mais provável, porque o potencial em grandes áreas por molécula se torna positivo com a presença da enzima, pois a contribuição negativa da dupla camada elétrica é compensada pela incorporação da HRP, que possui carga positiva no tampão pH 6.

Figura 23: Curva de potencial para DPPG e para DPPG com a enzima.

4.5. Elasticidade dinâmica

O método da gota pendente foi utilizado para avaliar a elasticidade dinâmica de monocamadas puras de fosfolipídios e mistas de fosfolipídio/enzima. Para iniciar a medida, uma solução de enzima foi usada para formar a gota. Depois de formada, aguarda-se o valor da tensão superficial se estabilizar, pois a enzima por difusão tende a se espalhar por toda a gota. Após

aproximadamente 7 minutos, a tensão superficial atinge o valor de equilíbrio, como vemos na Figura 24. Com a inserção de uma pequena quantidade de fosfolipídio na superfície da gota, percebemos que a tensão superficial apresentou ligeira queda, devido à alteração do estado de equilíbrio. Esse estado tende a retornar em torno de 10 minutos aproximadamente, como mostra a Figura 25.

Figura 24: Tensão superficial da solução enzimática em água.

Figura 25 : Tensão superficial da solução enzimática após a inserção de DPPG na superfície a uma pressão fixa.

A pressão aumenta com a inserção da enzima na monocamada lipídica (Tabela 1). A elasticidade dinâmica na presença de HRP diminui a uma dada pressão, já que com a interferência da enzima a monocamada tende a retornar ao equilíbrio, apresentando rigidez menor, sendo menos passível à deformação. Observa-se também que o valor da elasticidade dinâmica imaginária, que pode ser interpretada como a viscosidade da monocamada, variou com a adsorção da enzima. Em baixas pressões iniciais, a monocamada fosfolipídica tornou-se menos viscosa, e sob altas pressões ela tornou-se mais viscosa.

Tabela 1: Valores de elasticidade dinâmica variando-se a pressão superficial somente para o fosfolipídio e posteriormente com a enzima.

DPPG			DPPG+HRP		
Π_i (mN/m)	E (mN/m)	E_i (mN/m)	$\Delta\Pi$ (mN/m)	E (mN/m)	E_i (mN/m)
3,0	15,7	0,8	11,4	38,7	1,0
8,0	46,8	5,6	11,0	41,0	3,0
17,0	70,4	12,1	6,8	62,2	10,0
22,0	178,7	15,1	4,9	69,3	11,5
28,9	37,5	11,9	1,5	33,9	14,5

Nos resultados na Tabela 1, notamos que a elasticidade dinâmica da monocamada cresce com a pressão superficial da gota, já que a monocamada fica mais rígida, ou seja, é mais difícil comprimi-la ou expandi-la. Contudo, para altas pressões, aproximadamente 30 mN/m, os valores da elasticidade dinâmica tornam a baixar por repulsão eletrostática, pois as cadeias fosfolipídicas que possuem cabeças polares se aproximam e tendem a se repelir. A inserção da enzima na camada fosfolipídica afetou a elasticidade dinâmica, variando conforme a pressão e tornando a monocamada menos rígida. Esse fato revela forte interação lipídio/proteína e como a monocamada mista altera suas características comparadas com monocamadas puras. A uma pressão inicial de 3 mN/m, a introdução de proteína à interface causa um maior empacotamento. Sob pressões mais altas, a incorporação da enzima representa um novo material, mais flexível, introduzido no filme que já está com certo grau de compactação, o que causará menor rigidez na monocamada, e, portanto com um valor de elasticidade menor.

Figura 26 : Gráfico de pressão de superfície inicial vs. diferença de pressão do sistema DPPG/HRP.

A Figura 26 mostra que a mudança na pressão superficial causada pela incorporação de HRP diminui com o aumento da pressão de superfície inicial da monocamada de DPPG, típico de moléculas que estão sendo expelidas do sistema pela alta pressão da monocamada. Por regressão linear, infere-se uma pressão de exclusão em torno de 31 mN/m, ou seja, quando o sistema atinge esse valor de pressão superficial, a enzima não é mais capaz de penetrar na monocamada fosfolipídica.

4.6. Cinética de adsorção DPPG/HRP

Para investigar a cinética de adsorção da enzima nas camadas fosfolipídicas, medidas da variação da pressão de superfície em função do tempo foram realizadas a diferentes pressões iniciais. A Figura 27 mostra a cinética de adsorção da HRP em uma monocamada de DPPG à pressão superficial inicial de 10mN/m. Com o decorrer do tempo, a enzima tende a migrar para a superfície, ou seja, adsorver na monocamada de DPPG até atingir uma pressão de superfície em que o sistema se encontra estável, pressão essa em torno de 23 mN/m. A variação de pressão também foi monitorada e chegou-se ao valor de 17 mN/m.

Figura 27: Cinética de adsorção a pressão inicial de 10 mN/m.

A Figura 28 mostra também uma curva de cinética de adsorção, porém com pressão inicial de 20 mN/m. Nota-se maior dificuldade de a enzima adsorver na monocamada, pois há vários pontos onde a curva apresenta mecanismo de adsorção e logo após, dessorção. Isso se deve ao rearranjo a pressões mais altas que dificulta a enzima permanecer na superfície. Porém, o valor de variação da pressão superficial foi praticamente o mesmo da cinética realizada a 10 mN/m.

Figura 28: Cinética de adsorção a uma pressão de superfície inicial de 20 mN/m.

4.7. PM-IRRAS

Medidas de espectroscopia de infravermelho foram realizadas num espectrômetro infravermelho de reflexão e absorção, usando um polarizador modulador. Este equipamento, PM-IRRAS, é muito utilizado para estudar a conformação de moléculas de fosfolipídios numa interface ar-água ou em suportes sólidos. As medidas de PM-IRRAS permitiram analisar a conformação de monocamadas puras de DPPG e monocamadas mistas de DPPG/HRP. Os

espectros medidos somente com a enzima adsorvida na interface ar-água, livre de lipídios, são mostrados na Figura 29. O sinal da enzima aumentou com o tempo, indicando crescente adsorção enzimática até o tempo máximo de medida, enquanto a adsorção ainda não cessou. Isso é mais bem ilustrado na figura menor à direita na Figura 29, que mostra a pressão crescendo de 0 a 10 mN/m em 60 minutos. Aparecem quatro bandas significativas, sendo duas correspondentes aos grupos amida da cadeia enzimática e duas principais correspondentes aos grupos amina da cadeia. A banda em 1663 cm^{-1} corresponde aos grupos amida I da cadeia, que compõem as α -hélices da enzima. Já a banda em 1554 cm^{-1} corresponde ao grupo amida II, constituinte das folhas β da HRP. As outras duas bandas menos expressivas, em 1520 cm^{-1} e 1590 cm^{-1} , correspondem aos grupos amina da enzima. Uma banda pequena devida às folhas β aparece em 1619 cm^{-1} , bem menos intensas do que a banda em 1663 cm^{-1} . A posição do grupo amida I em estruturas α -hélices pode ser vista entre 1656 e 1649 cm^{-1} para proteínas⁴⁸. A expressiva banda do grupo amida I em comparação à da amida II indica que o eixo está paralelo à interface⁴⁹.

Figura 29: PM-IRRAS da enzima HRP adsorvendo sozinha na interface ar-água. Encarte à direita: Cinética de adsorção.

A medida da Figura 30 foi obtida com a enzima adsorvendo numa monocamada de DPPG na interface ar-água, na região de 2800 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} em que aparecem somente as bandas do fosfolípido. Duas delas foram expressivas, uma em 2840 cm^{-1} e outra em 2920 cm^{-1} correspondentes às vibrações dos grupos CH_2 simétricos e antissimétricos do DPPG, respectivamente^{39, 50}.

Figura 30: HRP adsorvendo na monocamada de DPPG pré-formada a uma pressão inicial de 10 mN/m na faixa de 2800 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} . Encarte à direita: Cinética de adsorção.

Figura 31: HRP adsorvendo numa monocamada de DPPG pré-formada a pressão inicial de 10 mN/m na faixa de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} .

A Figura 31 mostra o sinal de PM-IRRAS para HRP adsorvendo na monocamada de DPPG pré-formada, mas na faixa de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} . Para essas monocamadas mistas de DPPG/HRP a intensidade das bandas também aumenta com o tempo, devido à incorporação da HRP. Isso fica claro com o auxílio da figura menor ao lado da Figura 31. Interessante observar a inversão das bandas, agora com os picos virados para baixo, pouco comuns para espectros de PM-IRRAS. Esse resultado mostra que as ligações C=O da ligação peptídica se orientam perpendicularmente às cabeças hidrofílicas do fosfolípido⁵¹.

Essa inversão de sinais já foi relatada para a β -lactoglobulina⁵². Quando o ângulo de incidência está próximo do ângulo de Brewster - neste caso foi de 80° - as intensidades positivas sugerem momento de dipolo preferencialmente orientado no plano da superfície, enquanto as bandas negativas indicam orientação perpendicular⁴⁹. Além disso, os grupos amida C=O e amina

NH da HRP estão orientados preferencialmente perpendicularmente à interface, paralelos às cadeias relativamente organizadas do DPPG. Em outras palavras, a presença de lipídios na interface ar-água induz mudanças na orientação da HRP adsorvida. Um modelo para a adsorção da HRP nesse caso é mostrado na Figura 32, em que a HRP se adapta ao meio lipídico. Evidências claras dessas mudanças podem ser vistas em duas bandas expressivas de grupos amida II em 1540 e 1559 cm^{-1} , onde a banda em 1540 cm^{-1} indica a deformação N-H em β -folhas⁵³. Como indicam as principais bandas em 1653 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} , a HRP não é desnaturada na presença do DPPG⁴⁸.

Figura 32: Modelo para a adsorção da HRP numa interface ar-água em duas situações. À esquerda, numa interface sem lipídios. À direita, adsorção numa camada de DPPG pré-formada, na qual o eixo maior da enzima está orientado perpendicularmente à superfície.

A incorporação da HRP foi observada para outras pressões iniciais para monocamada de DPPG, com o mesmo comportamento descrito acima, mas a adsorção da proteína não foi observada para pressões ou maiores do que 30 mN/m , que corresponde à pressão de exclusão já descrita no item sobre elasticidade dinâmica¹⁶. Para inferir se partes da molécula da enzima ficam mais voltadas para a interface ar da monocamada durante a compressão, depois de adsorvida na

monocamada, foi obtido um sinal de PM-IRRAS para DPPG sozinho e depois com a enzima incorporada.

A Figura 33 mostra o espectro de PM-IRRAS para DPPG sozinho na interface. As bandas em 2917 e 2849 cm^{-1} descrevem o grupo CH_2 antissimétrico e simétrico, respectivamente. A banda antissimétrica é ligeiramente deslocada para números de onda menores com o acréscimo da pressão³⁹. A intensidade das bandas aumentou com a pressão de superfície, pois em pressões mais altas há maior número de cadeias por unidade de área.

Figura 33: PM-IRRAS de DPPG durante isotermas a diferentes pressões de superfície.

Os espectros PM-IRRAS de monocamadas mistas DPPG/HRP a diferentes pressões aparecem nas Figura 34 e Figura 35. Entre 2800 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} , só observamos bandas expressivas do fosfolípido, que correspondem aos grupos CH_2 simétricos e anti-simétricos da cadeia e o aumento da intensidade das bandas quanto maior a pressão superficial, porque as cadeias estão mais próximas, num estado mais condensado. Entre 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} ,

observa-se claramente a interação da HRP com o DPPG novamente pela inversão das bandas, e pelas bandas de amida I e II, tanto a baixas quanto a altas pressões superficiais.

Figura 34: PM-IRRAS de monocamadas mistas de DPPG e HRP durante a isoterma a diferentes pressões.

Figura 35: PM-IRRAS de monocamadas mistas de DPPG/HRP a diferentes pressões entre 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} .

A Figura 35 mostra que a HRP é notada até mesmo a altas pressões e não é expelida durante a compressão. Um número de onda mais alto para as bandas CH_2 do fosfolipídio foi observado devido à desordem induzida pela incorporação da HRP. Os picos invertidos novamente indicam que os grupos $\text{C}=\text{O}$ da amida e NH da amina estão orientados preferencialmente perpendiculares às cabeças fosfolipídicas, logo, perpendiculares à interface. Mudanças mínimas entre os espectros foram observadas entre as Figuras 31 e 35, indicando que a HRP não sofre mudanças consideráveis na estrutura secundária durante a compressão¹⁵.

4.8. Conclusões

Os resultados das caracterizações com os filmes de Langmuir de DPPG puro e misto com HRP indicaram forte interação entre enzima e fosfolipídio. A incorporação de HRP na

monocamada de DPPG depende do método de espalhamento, sendo que o mais eficaz pelos resultados confrontados com a literatura é o de injeção.

Na cinética de adsorção, vimos que a adsorção aumenta com o tempo, porém se estabiliza depois de atingidos valores próximos ao da pressão de exclusão. A elasticidade da monocamada mista diminui com a incorporação de HRP. As medidas de infravermelho revelaram interessante interação entre DPPG e HRP, com os picos das bandas expressivas da enzima invertidos, o que não ocorre se a enzima for adsorvida numa interface sem DPPG. Em todas as medidas ficou clara a presença da enzima incorporada à monocamada; e mesmo que mudando sua orientação, sua estrutura se mantém.

Capítulo 5

5. Resultados e discussão para filmes Langmuir-Blodgett

Confirmada a interação entre a enzima e a monocamada fosfolipídica por várias técnicas de caracterização, filmes Langmuir-Blodgett foram produzidos para verificar se as características do filme misto de Langmuir se mantêm com a enzima imobilizada na matriz e transferida a um suporte sólido.

5.1. Transferência dos filmes de Langmuir a suportes sólidos

Filmes LB foram depositados sobre suportes sólidos de quartzo, com taxa de transferência entre 1,1 e 1,3 para DPPG/HRP. A quantidade de massa depositada foi estimada com uma microbalança por cristal de quartzo. Para tal, os filmes LB foram depositados sobre quartzo piezelétrico recoberto com Au em ambas as faces para fazer contato com o sistema de aferição. O quartzo foi aferido antes e depois da deposição de fosfolipídio e através da equação de Sauerbrey²⁸, obtivemos a massa 492,02 ng para o filme LB de DPPG. Para a monocamada mista de DPPG/HRP, a massa total foi 700,96 ng. Ou seja, a diferença de massa de 208,94 ng corresponde à massa de HRP depositada.

Considerando a área do suporte sólido, essa massa corresponde a uma densidade enzimática de 230 ng/cm², levando a uma área por molécula de 2610 Å² determinada para HRP com massa molecular de aproximadamente 40000 Da⁵⁴. Este valor coincide com valores da literatura⁵⁵, em torno de 2800 Å² em medidas de fluorescência. Para visualizar a organização das

moléculas de HRP no suporte sólido, adotamos o formato de um elipsóide de raios 40, 67 e 117 $\text{\AA}$ para a HRP⁵⁶. O menor valor obtido pelo método de QCM revela a orientação do eixo maior da elipsóide perpendicular à matriz fosfolipídica, como mostra a Figura 36, em que os componentes do filme estão fora de escala para facilitar a visualização. A HRP está orientada perpendicularmente ao suporte, de acordo com os resultados de QCM.

Figura 36: Ilustração esquemática da deposição de filmes mistos de DPPG/HRP.

O modelo da Figura 36 é consistente com as medidas de PM-IRRAS, na qual os grupos C=O e NH estão preferencialmente orientados na interface. Tang et al⁵⁷ mostraram que a HRP muda sua conformação em contato com vesículas de fosfolípidios, adotando uma configuração similar à da figura 36, com a dimensão da molécula de HRP em contato com a superfície do lipossomo variando entre 40 e 50 $\text{\AA}$. Além disso, presumimos que a HRP se adapta ao meio lipídico.

5.2. Espectroscopia de fluorescência e de ultravioleta visível em filmes LB

A Figura 37 mostra o espectro na região do UV-vis para a solução de HRP, com três bandas principais, sendo que as bandas nas regiões de 220 e 275 nm correspondem às transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ dos grupos triptofanos da enzima. A banda na região de 400 nm foi atribuída ao grupo heme da peroxidase.

Figura 37: Espectro UV-vis para HRP em solução.

Para verificar a presença da enzima na matriz fosfolipídica, obtivemos espectros de fluorescência e de UV-vis para filmes LB, como mostram as Figuras 38 e 40. Na espectroscopia de UV-vis as bandas predominantes dos grupos triptofanos prevalecem mesmo no filme LB de uma única camada, confirmando a presença da enzima no filme. Contudo, a banda atribuída ao grupo heme não foi detectada, provavelmente porque o grupo heme é camuflado com a presença

do fosfolípido pela orientação enzimática observada nas medidas de PM-IRRAS em filmes de Langmuir.

Figura 38: Espectro UV-vis para filme LB de DPPG/HRP.

A espectroscopia de fluorescência também foi útil para detectar a enzima nos filmes LB. Primeiramente, um espectro somente com a solução de peroxidase foi obtido para verificar quais grupos da proteína apresentavam fluorescência. O espectro de fluorescência da HRP é mostrado na Figura 39, que mostrou emissão em torno de 335 nm devido à fluorescência dos grupos triptofano da proteína.

Figura 39: Espectro de fluorescência para solução de HRP.

Figura 40: Espectroscopia de fluorescência para filme LB de DPPG/HRP.

A fluorescência do filme LB mostrou uma larga banda entre 350 e 400 nm, típica de fluorescência dos grupos triptofano de proteínas, coincidindo com o pico da enzima em solução em torno de 350 nm o que mais uma vez confirmou a presença da HRP no filme LB.

5.3. Infravermelho em filmes LB

As bandas de infravermelho observadas nas medidas de PM-IRRAS em filmes de Langmuir também apareceram nos espectros de filmes LB de DPPG/HRP, como ilustrado na Figura 41, que mostra bandas amida I em 1656 cm^{-1} e 1627 cm^{-1} correspondentes às α -hélices da proteína e bandas amida II em 1540 , 1560 e 1580 cm^{-1} correspondentes às folhas β da proteína.

Figura 41: PM-IRRAS em filme LB de DPPG/HRP na região entre 1500 e 1700 cm^{-1} .

A Figura 42 mostra os sinais de infravermelho para o mesmo filme LB entre 1050 e 1300 cm^{-1} . As cinco bandas expressivas nessa região representam os sítios glucosídicos da enzima, o

que foi confirmado com o espectro somente da enzima em monocamadas de Langmuir nessa mesma região, como vemos na Figura 43.

Figura 42: PM-IRRAS em filme LB de DPPG/HRP entre 1000 e 1300 cm^{-1} .

Figura 43: PM-IRRAS para HRP em filme de Langmuir entre 1000 e 1300 cm^{-1} .

5.4. Microscopia óptica

As medidas de microscopia óptica para filmes LB não foram satisfatórias, pois o filme é muito fino, possuindo somente uma monocamada depositada, dificultando a visualização de sua morfologia. Algumas imagens de microscopia óptica antes e após as medidas de atividade enzimática estão ilustradas nas Figuras 44 e 45. São praticamente idênticas, não permitindo verificar possíveis alterações devidas à medida de atividade.

Figura 44: Microscopia óptica para filme LB de DPPG-HRP antes de medida de atividade enzimática. Imagem da amostra aumentada 40 vezes. Na escala menor: 5 µm.

Figura 45: Microscopia óptica para filme LB de DPPG-HRP depois de medida de atividade enzimática. Imagem da amostra aumentada 40 vezes. Na escala menor: 10 µm.

5.5. Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica foi útil por permitir maior resolução. As medidas de microscopia de força atômica foram realizadas também para verificar se a morfologia dos filmes LB se mantém após as medidas de atividade enzimática. A Figura 46 mostra a imagem para o suporte sólido onde foi depositado o filme. Já a Figura 47 mostra a morfologia de um filme LB de uma camada de DPPG/HRP, antes da medida de atividade enzimática.

Figura 46: AFM do suporte sólido antes de depositado o filme LB.

Figura 47: AFM de filme LB de DPPG-HRP antes de medida de atividade enzimática

Na Figura 48, o filme LB já foi submetido à medida de atividade enzimática e a sua arquitetura continuou a mesma, mostrando que o meio reacional não altera a configuração do filme, podendo ser utilizado por mais vezes.

Figura 48: AFM de filme LB de DPPG-HRP após medida de atividade enzimática.

5.6. Atividade enzimática

A imobilização de enzimas em matrizes sólidas é um desafio em termos de preservação da atividade enzimática. O suporte sólido e o meio de imobilização devem evitar que a enzima se desnature e preservar ao máximo sua estrutura e atividade. Neste contexto, a geometria da molécula da enzima imobilizada é importante não só para a sua conformação para as funções biológicas, mas também para o posicionamento certo do sítio catalítico no substrato. A desnaturação de enzimas em matrizes sólidas é comum^{58,59}. Sua atividade pode ser mais alta⁶⁰ ou mais baixa⁵⁸ do que em meio homogêneo. Para enzimas imobilizadas em matrizes fosfolipídicas,

como no caso HRP em DPPG, o empacotamento se adapta como uma interface bioinspirada, com a atividade das enzimas otimizada.

A atividade enzimática dos filmes LB de DPPG/HRP foi monitorada em meio reacional de pirogalol, que absorve em 420 nm⁶¹ e H₂O₂. As medidas foram feitas na ausência da luz devido a componentes fotossensíveis da reação. O tempo de intervalo de cada medida foi de aproximadamente 5 minutos, devido ao tempo de resposta do equipamento. A curva de absorbância vs. tempo de reação obtida é mostrada na Figura 49. Para calcular a atividade utilizamos a relação de Beer-Lambert⁴⁵:

$$\Delta A = \Delta C \epsilon L \quad (6)$$

Em que:

ΔA = variação da absorbância no tempo

ΔC = concentração da enzima

L = comprimento da amostra

ϵ = constante de Lambert (2470 mol⁻¹cm⁻¹L)

Através da relação da atividade enzimática com a derivada primeira da curva e utilizando o valor de massa depositada obtido em QCM, a atividade enzimática estimada foi de 1815 nanogramas de purpurogalina por minuto por miligrama de enzima, um valor acima daquele obtido em meio homogêneo, que foi de 1480 ng de purpurogalina por minuto por mg de enzima e de um filme automontado de HRP/Ch, como será mostrado adiante.

Figura 49: Atividade enzimática para filme LB de DPPG/HRP.

Figura 50: Reação da transformação de pirogallol em purpurogalina na presença de peróxido de hidrogênio e peroxidase.

A Figura 50 ilustra a reação durante o funcionamento do biossensor de peróxido, em que o pirogallol em contato com o peróxido na presença de peroxidase resulta em purpurogalina⁶², esta que tem pico de absorbância em 420 nm. Essa absorbância muda com o tempo de reação de conversão de pirogallol em purpurogalina na presença da peroxidase, pois o aumento da banda significa mais quantidade de purpurogalina formada durante a reação, indicando a atuação da peroxidase. Por isso, a medida da atividade enzimática foi feita em 420 nm⁶¹. Um trabalho

semelhante⁶³ mostra a reação da peroxidase com o pirocatecol, em que a banda de absorção muda para 510 nm. A estabilidade do filme LB de DPPG/HRP também foi significativa, pois mais de 90% da atividade foi mantida no biossensor após duas semanas de preparação. Esta estabilidade é superior à relatada na literatura. Por exemplo, em meio homogêneo a máxima atividade da HRP foi 70%^{56,64}, e em outros trabalhos menos de 50% foram mantidos para a HRP imobilizada^{55,65}.

Uma das explicações para a atividade da enzima imobilizada ser maior do que em meio homogêneo pode ser que a orientação da enzima é mais favorável no filme LB, deixando seu sítio ativo mais susceptível à reação de oxidação de peróxido. De fato, Gajhede et al⁵⁴ propuseram que o substrato deixa o sítio catalítico livre pela compressão da monocamada. A HRP possui uma extensa rede de pontes de hidrogênio em volta de seu grupo heme e acredita-se que as interações hidrofóbicas causam esse canal de abertura por quebra das ligações de hidrogênio, facilitando o acesso do analito ao sítio ativo. A mudança na conformação da HRP pode então ocorrer porque a membrana de DPPG afeta a rede de pontes de hidrogênio da HRP no grupo heme.

Ressalta-se que na formação dos filmes LB, a enzima foi injetada na subfase, sob uma monocamada de DPPG pré-formada. Isto certamente conduziu a adsorção e a orientação das moléculas, penetrando na monocamada ou simplesmente interagindo com as cabeças polares do fosfolípido.

5.7. Conclusões

A incorporação de HRP em filmes LB de DPPG foi confirmada por vários métodos, incluindo espectroscopias de fluorescência, de absorção no UV-vis e infravermelho. A transferência da monocamada para o suporte sólido foi satisfatória, chegando a valores bem próximos do ideal. A massa de enzima transferida para o suporte pôde ser quantificada pelo método da balança de cristal de quartzo, do qual se obteve adsorção de mais de 200ng de enzima.

A presença do filme foi também visualizada por microscopia de força atômica. A atividade enzimática foi monitorada em meio reacional de peróxido, sendo maior no filme LB do que para a enzima em meio homogêneo, o que é importante porque mostra que a matriz de DPPG é adequada para imobilização de HRP.

Capítulo 6

6. Resultados e discussão para filmes automontados

Os filmes automontados de HRP com quitosana (Ch) foram obtidos para comparação com os filmes LB. Nosso objetivo aqui foi caracterizá-los com relação à adsorção, crescimento de filme, estrutura e atividade enzimática, para permitir identificar qual método é mais adequado para a produção de biossensores.

6.1. Microgravimetria e crescimento de filme

A técnica de automontagem foi utilizada para imobilizar a enzima HRP em um polissacarídeo, a quitosana (Ch), que é biocompatível e se liga facilmente sem desnaturar a enzima. O objetivo é verificar sua possível utilização como biossensor, explorando a atividade enzimática na detecção de analitos, como o peróxido de hidrogênio. Para isso, depositamos o polissacarídeo e a enzima e caracterizamos o filme adsorvido com microbalança de cristal de quartzo, que permite analisar a cinética de adsorção da HRP. A Figura 51 mostra a variação no tempo da frequência de ressonância do cristal de quartzo piezelétrico.

Figura 51: Curva de variação da frequência vs tempo de adsorção para cada bicamada de Ch/HRP.

Na Figura 52, obtivemos o gráfico de tempo de adsorção com relação ao número de bicamadas (Ch/HRP). Podemos concluir que quanto maior o número de bicamadas, menor será o tempo de adsorção, possivelmente devido às alterações na rugosidade do filme, e conseqüentemente na capacidade de adsorção da enzima à matriz polimérica.

Figura 52: Curva de relação entre número de bicamadas com o tempo.

A Figura 53 apresenta a variação da massa e frequência com relação ao tempo de deposição. Como a massa aumenta com a diminuição da frequência, podemos calcular a variação de massa obtida por cada bicamada, que foi de 400ng. Pode-se também estimar o número de moléculas de HRP depositadas, considerando a massa molecular da enzima, que é 40.000. O valor obtido foi de $6 \cdot 10^{12}$ moléculas de HRP depositadas. Sabe-se da literatura⁶⁶ que a peroxidase de raiz forte se encontra na forma de dímeros, com área total de $12560 \text{ \AA}^2$ (ou área por monômero de aproximadamente $6000 \text{ \AA}^2$). A partir da área do cristal de quartzo usado na adsorção, obtém-se uma área ocupada por molécula de HRP de $6280 \text{ \AA}^2$, de onde se conclui a formação de uma camada de espessura monomolecular para a enzima depositada.

Figura 53: Variação de massa e variação da frequência com relação ao tempo de deposição.

O crescimento do filme LbL de quitosana com peroxidase foi monitorado por espectroscopia UV-vis pois em geral, a intensidade absorvida é proporcional à quantidade de material adsorvido e por espectroscopia de fluorescência, já que a intensidade do pico pode ser associada à presença de enzima no filme. Os espectros foram obtidos bicamada por bicamada como mostram as Figura 54 e Figura 55.

Figura 54: Crescimento de filme LbL Ch/HRP por UV-vis.

Figura 55: Crescimento de filme LbL CH/HRP por fluorescência.

Não é fácil obter informações quantitativas dos espectros da Figura 54, porque a linha de base se altera com o número de bicamadas. O espalhamento é todavia crescente, o que indica a formação do filme. Já os espectros de fluorescência da Figura 55 confirmam inequivocamente a adsorção da HRP, pois a emissão em 375 nm é característica de grupos triptofano⁶⁷.

A Figura 56 mostra que a emissão aumenta linearmente com o número de bicamadas, o que é indicativo de que a mesma quantidade de material é adsorvida a cada bicamada.

Figura 56: Variação do número de bicamadas formadas com a absorvância em filme LbL de Ch-HRP.

6.2. Microscopia óptica

A microscopia óptica auxiliou na visualização da estrutura do filme automontado após as sete camadas adsorvidas e mostrou uma interessante organização da enzima sobre a quitosana, como mostram as Figuras 57, 58 e 59 para ampliações que variam de 20, 40 e 100 vezes.

Figura 57: Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP antes de medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 20 vezes. Na escala menor: 20 μm.

Figura 58: Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP antes de medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 40 vezes. Na escala menor: 10 μm.

Figura 59: Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP antes de medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 100 vezes. Na escala menor: 5 µm.

Nossa conclusão para essas imagens foi de que como a enzima HRP se apresenta em formato de fibrilas, quando adquiridas na forma de pó, essa estrutura se manteve no filme sobre a matriz de Ch. Um outro fator importante é que as interações na formação do filme são diferentes comparadas com filmes LB. No processo de automontagem por adsorção física, somente interações eletrostáticas atuam nos componentes, não há nenhuma mudança na pressão superficial do filme ou compressão que faz com que a HRP adsorva de modo semelhante à ocorrida na matriz fosfolipídica, que ao contrário da quitosana, é uma molécula anfifílica.

As medidas de atividade enzimática em meio reacional de pirogalol e peróxido, que descreveremos no tópico pertinente, afetaram a morfologia dos filmes automontados, como mostram as imagens nas Figuras 60, 61 e 62 para uma amostra aumentada 20, 40 e 100 vezes respectivamente.

Figura 60: Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP após medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 20 vezes. Na escala menor: 20 μm .

Figura 61: Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP após medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 40 vezes. Na escala menor: 10 μm .

Figura 62: Microscopia óptica para um filme LbL de Ch-HRP após medida de atividade enzimática. Imagem aumentada 100 vezes. Na escala menor: 5 µm.

Essas imagens mostram que após o filme entrar em contato com o meio reacional perde a sua estrutura inicial. Note que as linhas e fibras formadas pela enzima se desfazem provavelmente devido à reação no processo de hidrólise do peróxido de hidrogênio.

6.3. Microscopia de força atômica

A alteração na morfologia causada pelas medidas de atividade foi confirmada por microscopia de força atômica, o que se pode notar pela comparação das imagens das Figuras 63 e 64 obtidas antes e após as medidas de atividade, respectivamente. A estrutura fibrilar da Figura 63 é destruída com as medidas de atividade enzimática

Figura 63: AFM de filme LbL de Ch-HRP antes da medida de atividade enzimática (80x80 μm).

Figura 64: AFM de filme LbL de Ch-HRP após medida de atividade enzimática (80x80 μm).

6.4. Atividade enzimática

Dos resultados de absorbância vs. comprimento de onda, estimamos a atividade da enzima, a partir de um gráfico de absorbância em função do tempo, mostrado na Figura 65. Pelo coeficiente angular, obteve-se $349 \text{ ng P min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{E}$, isto é, 349 nanogramas de produto (pirogalol) por minuto por miligrama de enzima.

Figura 65: Atividade enzimática para filme LbL de Ch/HRP.

6.5. Conclusões

Os filmes automontados foram caracterizados quanto à massa adsorvida e o tempo da adsorção de cada camada. Monitoramos o crescimento do filme tanto em espectroscopia no ultravioleta quanto em fluorescência e pudemos notar o aumento da absorbância proporcional ao número de bicamadas. Além disso, as medidas de microscopia revelaram uma interessante arquitetura que não se mantém após as medidas de atividade enzimática em meio reacional. A atividade enzimática foi mais baixa do que para filme LB e mesmo com relação à enzima em meio homogêneo.

Capítulo 7

7. Conclusões finais e perspectivas futuras

Este trabalho mostrou que a enzima HRP possui forte interação com monocamadas lipídicas, que é mantida quando filmes LB são obtidos a partir da transferência dos filmes de Langmuir. Vimos que a adsorção da enzima na interface depende do método em que se espalha a solução na cuba de Langmuir, e o pelos resultados vimos que uma melhor adsorção ocorre onde se injeta pequenas alíquotas de solução enzimática sob a monocamada lipídica.

A enzima afeta o empacotamento das cadeias na monocamada, mas também é afetada na sua presença, evidência mostrada nos resultados de infravermelho, onde a enzima gira ao penetrar na monocamada lipídica, o que não acontece para espectros tirados da peroxidase sozinha em solução.

A conformação e atividade enzimática foram mantidas nos filmes LB, sendo a atividade inclusive maior do que para a HRP em meio homogêneo.

A enzima também interage com matrizes polissacarídicas, na qual podem ser adsorvidas com facilidade. A morfologia do filme não se mantém após medidas de atividade do biossensor, mostrando que o filme não pode ser reutilizado.

Estes resultados provam que é possível e viável a construção de um biossensor de peróxido de hidrogênio, sendo que a melhor forma de fabricação e otimização das características funcionais da enzima é o método de Langmuir e Langmuir-Blodgett, na qual a enzima preserva as suas características.

Para obter um protótipo de biossensor, que garanta alta sensibilidade e seletividade para o peróxido, ainda é necessário realizar um trabalho mais aprofundado em características específicas, que deve envolver medidas com diferentes pHs e temperaturas nas medidas de atividade enzimática. Além disso, para melhor simular o meio em que o biossensor atua, o meio reacional deve não só conter peróxido de hidrogênio, mas também outros compostos para que possamos avaliar a seletividade do biossensor obtido.

REFERÊNCIAS*

- ¹ GIRARD-EGROT, A.P., GODOY, S., BLUM, L.J, Enzyme association with lipidic Langmuir-Blodgett films: interests and applications in nanobioscience. *Advanced in Colloids and Interface Science*, v.116, p.205-225, 2005.
- ² LANGMUIR, I., Constitution and fundamental properties of solids and liquids. *Journal of American Chemical Society*, v.39, p.1848, 1917.
- ³ BLODGETT, K., Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *Journal of American Chemical Society*, v.57, p.1007, 1935.
- ⁴ LEBLANC, R.M., Molecular recognition at Langmuir monolayers. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.10, p.529-536, 2006.
- ⁵ SURFACTANTES e micelas: uma aula virtual, Revista Eletrônica do Departamento de Química da UFSC, ano 4. Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/micela/index.html>>. Acesso em: 03/04/2007.
- ⁶ EXPERT Protein Analysis System of Swiss Institute of Bioinformatics. Disponível em: <www.expasy.org>. Acesso em: 17/09/2007.
- ⁷ VEITCH, N.C., Horseradish Peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, v.65, p.249-259, 2004.
- ⁸ MARAÑÓN, M.J.R., VAN HUYSTEE, R.B., Plant Peroxidases – interaction between their prosthetic group. *Phytochemistry*, v.37, p.1217-1225, 1994.
- ⁹ LIU, X. et al, Electron transfer reactivity and the catalytic activity of horseradish peroxidase incorporated in dipalmitoylphosphatidic acid films. *Bioelectrochemistry*, v.68, p.98-104, 2006.
- ¹⁰ MAEDA, Y., FUJIHARA, M., IKEDA, I., Spectroscopy study on structure of horseradish peroxidase in water and dimethyl sulfoxide mixture. *Biopolymers*, v.67, n.2, p.107-112, 2002.
- ¹¹ RAZOLA, S.S. et al, Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, v.17, p.921-928, 2002.
- ¹² KASAI, S. et al, Simultaneous detection of uric acid and glucose on a dual-enzyme chip using scanning electrochemical microscopy/scanning chemiluminescence microscopy. *Analytica Chimica Acta*, v.458, n.2, p.263-270, 2002.
- ¹³ BUDDE, C.L. et al. Enzymatic nitration of phenols. *Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic*, v.15, p.1-3, 55-64, 2001.

-
- ¹⁴ TRAKHTENBERG, S. et al. Photo-cross-linked immobilization of polyelectrolytes for enzymatic construction of conductive nanocomposites. *Journal of American Chemical Society*, v.127, n.25, p.9100-9104, 2005.
- ¹⁵ SCHMIDT, T.F. et al. Enhanced activity of horseradish peroxidase in Langmuir-Blodgett films of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, v.1778, 2008. (in press) DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.05.012
- ¹⁶ SCHMIDT, T.F. et al, Interaction of horseradish peroxidase with Langmuir monolayers of phospholipids, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 321, 206-210, 2008.
- ¹⁷ KRAJEWSKA, B., Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Separation and Purification Technology*, v.41, n.3, p.305-312, 2005.
- ¹⁸ SOROKIN, A.B. et al, Chitosan supported phthalocyanine complexes: bifunctional catalysts with basic and oxidation active sites. *Applied Catalysis A-general*, v.309, n.2, p.162-168, 2006.
- ¹⁹ CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA 4ª REGIÃO. *A química das quitosanas.*, Disponível em: <www.crq4.org.br/qv_quitosanas>. Acesso em: 21/08/2006.
- ²⁰ SILVA, H.R.S.C, DOS SANTOS, K.S.C.R., FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v.29, n.4, p.776-785, 2006.
- ²¹ XU, Q. et al. Immobilization of horseradish peroxidase on O-carboxymethylated chitosan sol/gel matrix. *Reactive and Functional Polymers*, v.66, n.8, p.863-870, 2006.
- ²² FERREIRA, M. et al. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett. *Química Nova*, v.28, n.3, p.502-510, 2005.
- ²³ PETTY, M.C. *Langmuir-Blodgett Films - an introduction*, Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- ²⁴ LANGMUIR, I., BLODGETT, K.B. Über einige neue Methoden zur Untersuchung von monomolekularen Filmen. *Colloid and Polymer science.*, v.73, n.3, p.257-263, 1935.
- ²⁵ DECHER, G., HONG, J.D., SCHIMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, v.210-211, n.1-2, p.831-835, 1992.
- ²⁶ PATERNO, L.G., MATTOSO, L.H.C., OLIVEIRA JR, O.N., Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicação. *Química Nova*, v.24, n.2, p.228-235, 2001.

-
- ²⁷ DECHER, G., HONG, J.D. Buildup of ultrathin multilayers films by a self-assembly process .1. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia*, v.46, p.321-327, 1991.
- ²⁸ CAMILO, C.S. et al. Surface-relief gratings and photoinduced birefringence in layer-by-layer films of chitosan and an azopolymer. *Biomacromolecules*, v.4, p.1583, 2003.
- ²⁹ NOBLET, A., RIDELAIRE, H., SYLIN, G. Measurement of surface-potentials. *Journal of Physics E: scientific instruments*, v.17, n.3, p.234-239, 1984.
- ³⁰ OLIVEIRA JR, O.N., TAYLOR, D.M., MORGAN, H. Modelling the surface potential-area dependence of a stearic acid monolayer. *Thin Solid Films*, v.210, n.1-2, p.76-78, 1992.
- ³¹ CASELI, L. Influência da âncora de glicosilfosfatidilinositol na imobilização da fosfatase alcalina da placa óssea imobilizada em sistemas miméticos de membranas celulares: monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett de fosfolípidios. 2005, 155p. Tese (Doutorado em Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- ³² CASELI, L. et al. Adsorption kinetics and dilatational rheological studies for the soluble and anchored forms of alkaline phosphatase at the air-water interface. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.16, n.5, p.969-977, 2005.
- ³³ O'SULLIVAN, C.K., GUILBAULT, G.G. Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v.14, n.8-9, p.663-670, 1999.
- ³⁴ SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Microwagung. *Zeitschrift für Physik*, v.155, p.206-212, 1959.
- ³⁵ OKAHATA, Y., ARIGA, J. In situ weighing of water-deposited Langmuir-Blodgett films on a piezoelectric quartz plate. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, v.20, p.1535-1537, 1987.
- ³⁶ OKAHATA, Y., ARIGA, K. Characterization of Langmuir-Blodgett films. 7. Swelling behavior and stability of Langmuir-Blodgett films deposited on a quartz crystal microbalance in a water phase. *Thin Solid Films*, v.178, p.465-471, 1989.
- ³⁷ DAMOS, F.S., MENDES, R.K., KUBOTA, L.T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. *Química Nova*, v.27, n.6, p.970-979, 2004.
- ³⁸ OKAHATA, Y., KIMURA, K., ARIGA, K. Characterization of LB films. 6. Detection of the phase-transition of Langmuir-Blodgett films on a quartz crystal microbalance in an aqueous phase. *Journal of the American Chemical Society*, v.111, n.26, p.9190-9194, 1989.

-
- ³⁹ DICKO, A., BOURQUE, H., PÉZOLET, M. Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air-water interface and transferred on solid substrates. *Chemistry and Physics of lipids*, v.96, n.1-2, p.125-139, 1998.
- ⁴⁰ BLAUDEZ, D. et al. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions*, v.92, n.4, p.525-530, 1996.
- ⁴¹ NUANCE. *Keck Interdisciplinary Surface Science Center*, Northwestern University. Disponível em: <<http://www.nuance.northwestern.edu/KeckII/ftir3.asp>> Acesso em: 15/01/2008
- ⁴² URAKAWA, A., BÜRGI, T., BAIKER, A., Modulation excitation PM-IRRAS: a new possibility for simultaneous monitoring of surface and gas species and surface properties, *Chimia*, v.60, n.4, p.231-233, 2006.
- ⁴³ KERN, W., Purifying Si and SiO₂ surfaces with hydrogen peroxide, *Semiconductor International*, April, p.94-99, 1984.
- ⁴⁴ SINGER, S.J., NICHOLSON, G.L., Fluid mosaic model of structure of cell-membranes, *Science*, v.175, n.4023, p.720-731, 1972.
- ⁴⁵ KANNER, J., KINSELLA, J.E., Lipid deterioration initiated by phagocytic-cell in muscle foods – beta-carotene destruction by a myeloperoxidase hydrogen-peroxide halide system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.31, n.2, p.370-376, 1983.
- ⁴⁶ DAVIES, J.T., RIDEAL, E.K., *Interfacial Phenomena*. New York: Academic Press, 1963.
- ⁴⁷ BORISSEVITCH, G.P., TABAK, M., OLIVEIRA JR., Interaction of dipyrindamole with lipids in mixed Langmuir monolayers, *Biochimica Biophysica Acta*, v.1278, p.12-18, 1996.
- ⁴⁸ CORNUT, I. et al, In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipatic peptides at the air-water interface, *Biophysics Journal*, v.70, p.305-312, 1996.
- ⁴⁹ BLAUDEZ, D. et al, Polarization-modulated FTIR spectroscopy of a spread monolayer at the air-water interface, *Applied Spectroscopy*, v.47, p.869-874, 1993.
- ⁵⁰ BLAUDEZ, D. et al, Characterization of Langmuir-Blodgett monolayers using polarization modulated FTIR spectroscopy, *Thin Solid Films*, v.210/211, n.1-2, p.648-651, 1992.
- ⁵¹ BRINGEZU, F. et al, Penetration of the antimicrobial peptide dicynthaurin into phospholipid monolayers at the liquid-air interface, *ChemBioChem*, v.8, n.9, p.1038-1047, 2007.
- ⁵² ZHANG, X., GE, N., KEIDERLING, T.A. Electrostatic and hydrophobic interactions governing the interaction and binding of beta-lactoglobulin to membranes. *Biochemistry*, v.46, p.5252-5360, 2007.

-
- ⁵³ LUKES, P.J., PETTY, M.C., YARWOOD, J. An infrared study of the incorporation of ion channel forming peptides into Langmuir-Blodgett films of phosphatidic acid. *Langmuir*, v.8, p.3043-3050, 1992.
- ⁵⁴ GAJHEDE, M. et al. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology*, v.4-12, p.1032-1038, 1997.
- ⁵⁵ VIANELLO, F. et al. Preparation, morphological characterization and activity of thin films of horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, v.68, p.488-495, 2000.
- ⁵⁶ NAVES, A.F. CARMONA-RIBEIRO, A.M., PETRI, D.F.S., Immobilized horseradish peroxidase as a reusable catalytic for emulsion polymerization. *Langmuir*, v.23, p.1981-1987, 2007.
- ⁵⁷ TANG, J. et al. Conformation change of Horseradish peroxidase in lipid membrane. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.120, n.1-2, p.119-129, 2002.
- ⁵⁸ CASELI, L. et al. Surface density as a significant parameter for the enzymatic activity of two forms of alkaline phosphatase immobilized on phospholipids Langmuir-Blodgett films. *Journal of Colloid Interface Science*, v.275, p.123-130, 2004.
- ⁵⁹ NAKAGAWA, T. et al. New method for fabricating Langmuir-Blodgett films of water-soluble protein with retained enzyme activity. *Thin Solid Films*, v.202, p.151-156, 1991.
- ⁶⁰ CASELI, L. et al. Using phospholipids Langmuir and Langmuir-Blodgett films as matrix for urease immobilization. *Journal of Colloid Interfacial Science*, v.319, p.100-108, 2008.
- ⁶¹ TAUBER, H. Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystalline catalase. *Journal of Biological Chemistry*, v.205, n.1, p.395-400, 1953.
- ⁶² SIGMA-ALDRICH. Peroxidase enzymes and reagents. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Analytical_Enzymes/Peroxidase_Enzymes.html>. Acesso em: 18/08/2006.
- ⁶³ MOLAEI RAD, A. et al. Spectroscopy assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol-aniline coupling hydrogen donor. *Analytical Biochemistry*, v.362, p.38-43, 2007.
- ⁶⁴ ALVAREZ, S., MANOLACHE, S., DENES, F. Synthesis of polyaniline using horseradish peroxidase immobilized on plasma-functionalized polyethylene surface as initiator. *Journal of Applied Polymer Science*, v.88, p.369-379, 2003.
- ⁶⁵ BERZINA, T.S., PIRAS, L., TROISTKY, V.I. Study of horseradish peroxidase activity in alternate-layer Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films*, v.327-329, p.621-626, 1998.
- ⁶⁶ GAZARYAN, I.G. et al. Formation and properties of dimeric recombinant horseradish peroxidase in a system of reversed micelles. *Biochemical Journal*, v.328, p.643-647, 1997.

-
- ⁶⁷ SHEN, C. et al. The protein fluorescence and structural toolkit: database and programs for the analysis of protein fluorescence and structural data. *Proteins: structure, function and bioinformatics*, v.71, n.4, p.1744-1754, 2008.

ANEXO – I:
Artigo publicado na *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and
engineering aspects*

Available online at www.sciencedirect.com

Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 321 (2008) 206–210

COLLOIDS
AND
SURFACES
Awww.elsevier.com/locate/colsurfa

Interaction of horseradish peroxidase with Langmuir monolayers of phospholipids

Thaís F. Schmidt^a, Luciano Caseli^{a,*}, Thatyane M. Nobre^b,
Maria E.D. Zaniquelli^b, Osvaldo N. Oliveira Jr.^a

^a Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil^b Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Received 26 June 2007; received in revised form 3 October 2007; accepted 24 January 2008

Available online 5 February 2008

Abstract

The method employed to incorporate guest molecules onto phospholipid Langmuir monolayers plays an important role in the interaction between the monolayer and the guest molecules. In this paper, we show that for the interaction between horseradish peroxidase (HRP) and a monolayer of dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) does depend on the method of HRP incorporation. The surface pressure isotherms of the mixed DPPG/HRP monolayers, for instance, were less expanded when the two materials were co-spread than in the case where HRP was injected into the subphase. Therefore, the method for incorporation affected not only the penetration of HRP but also the changes in molecular packing caused to the DPPG monolayer. With experiments with the monolayer on a pendant drop, we observed that the incorporation of HRP affects the dynamic elasticity of the DPPG monolayer, on a way that varies with the surface pressure. At low pressures, HRP causes the monolayer to be more rigid, while the converse is true for surface pressures above 8 mN/m. Taken all the results together, we conclude that HRP is more efficiently incorporated if injected into the subphase on which a DPPG monolayer had been spread and that the interaction between HRP and DPPG is maintained even at high surface pressures. This is promising for the possible transfer of mixed films onto solid substrates and for applications in biosensors and drug delivery systems. © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Horseradish peroxidase; Langmuir monolayers; Pendant drop; Phospholipids

1. Introduction

Molecular recognition is the most important process to build biological systems and to mimic cell membrane [1], which are made of proteins and lipids arranged in a way that their interaction maintains the selective permeability of the membrane. Protein–lipid interactions are also involved in recognizing specific molecules, which is useful for drug delivery [2] and biosensors [3]. As major building blocks of biological membranes, phospholipids have been extensively studied over the last decades using a variety of approaches. Langmuir monolayers at the air–water interface, in particular, exhibit properties that can be easily examined by many techniques, serving therefore as suitable models for biomembranes [4]. With Langmuir

monolayers, interactions in two-dimensional arrangements of amphiphilic molecules can be investigated with the unique advantage that the density and composition of the lipids can be controlled. The energetics involved in the membrane at distinct stages of packing can be studied via surface tension measurements. Furthermore, the transfer of mixed phospholipid–enzyme monolayers onto solid supports using the Langmuir–Blodgett technique has been used to produce biosensors, in which one exploits the capability of phospholipids in preserving the enzyme conformation [3].

Among the proteins that may be studied in phospholipid Langmuir and LB films, we chose the horseradish peroxidase, for which there is no report in the literature—to the best of our knowledge. Peroxidases are oxide-reductase enzymes with hydrogen peroxide as electron acceptor [5]. Immobilization matrices for peroxidases include proteins, phospholipids, fatty acids and polysaccharides. The horseradish peroxidase is extracted from a hardy perennial herb, whose roots are

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3373 8061; fax: +55 16 3371 5365.
E-mail address: lcaseli@usp.br (L. Caseli).

particularly important for culinary [5]. Studies concerning the interaction of this enzyme with phospholipids are still scarce in the literature though [6].

With the example of horseradish peroxidase, in this work we address another relevant aspect of cell membrane models, namely the strategy of incorporation of proteins in lipid films at the air–water interface. Several methods of co-mixing may be used, which result in different surface behaviors and micro-heterogeneities [7]. Such differences are important not only to probe interactions of proteins in cell membranes, but also for the construction of artificial systems containing proteins. The latter is the case of as bio-devices, such as biosensors [3]. Although horseradish peroxidase (HRP) is not properly a membrane protein, organized proteo-lipid nanostructures can be obtained to allow accurate manipulation of the biomacromolecule, which can be immobilized in a layered lipid structure that is highly controlled in terms of composition, thickness and charge [3]. Because HRP is soluble in water and amphiphilic, mixtures with lipids may have an impact in the polypeptide structure. Here, we investigate the interaction between horseradish peroxidase (HRP) and a phospholipid at the air–water interface through quasi-equilibrium (Langmuir trough) and dynamic (pendant drop) conditions, using different methods of enzyme–lipid spreading conditions on the air–water interface.

2. Materials and methods

Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) and horseradish peroxidase (HRP) were purchased from Sigma, and the other chemicals were of the highest purity available. DPPG solutions (0.5–1.0 g/L) in chloroform:methanol (4:1 v/v) were spread on a 0.05 g/L phosphate buffer (with ionic strength controlled by 0.01 mol/L NaCl and pH 6.3) in a Nima Langmuir trough (model 601M, subphase volume: 500 mL). DPPG was chosen the abundance of lipids with glycerol polar heads in natural cell membranes and because it has opposite charge to HRP, which is positively charged at the conditions used in this paper. For producing mixed DPPG–HRP Langmuir monolayers, several methods were tested. In all cases a total mass of 40 μ g of HRP and 75 μ g of DPPG was used, corresponding to a lipid:enzyme ratio of 99:1 (mol:mol) in the trough. The surface pressure was measured with the Wilhelmy method, with monolayer compression performed using two barriers at a 10 cm²/min rate to obtain surface pressure–area isotherms. All measurements were carried out at 23 $\pm$ 1 °C with water purified by a Milli-Q® system (18.2 Ω m and pH 6.3).

The methods for HRP incorporation are referred to as: (i) *co-spreading*: DPPG and HRP were dissolved together in a solution of chloroform, methanol and water (2:1:0.3 v/v/v); (ii) *subphase formation*: an aqueous HRP solution (0.15 μ g/mL) filled the trough as subphase before DPPG spreading; (iii) *injection*: HRP solution was injected in the subphase after DPPG spreading; (iv) *on the top*: after DPPG spreading on the buffer solution, HRP was spread on the interface. This indicates that HRP and DPPG were both spread on the buffer solution, similarly to the method (i), but in separated steps.

Dynamic dilatational elasticity measurements were performed with the pendant drop technique (OCA-20 from Dataphysics Instruments Gmbh, Germany, with oscillating drop accessory ODG-20). The HRP–DPPG mixed films were formed by gently touching a 15 μ L drop of the aqueous enzyme solution (0.05 g/L) with 1 μ L 10^{−4} mol/L chloroform/methanol DPPG solution. A new surface was formed by expanding the drop, and then the surface pressure was monitored with time. After adsorption equilibrium was reached, periodic oscillations with amplitude of 0.1 mm and 1 Hz frequency were imposed to the drop. The elasticity values were estimated as described elsewhere [8], determining the relation between the area deformation and the change in surface pressure.

3. Results and discussion

Two important parameters in the interaction between lipid Langmuir monolayers and guest biomolecules are the location of the guest molecule in the monomolecular film, and the changes in film fluidity and permeability due to the incorporation. The surface pressure–area isotherm of a DPPG monolayer was affected to different extents depending on the method to incorporate HRP, as depicted in Fig. 1. The isotherm for the pure DPPG is consistent with results from the literature obtained under similar conditions [9]. When the enzyme and lipid were co-spread with the same solution, the mixed monolayer displayed an expansion effect at low surface pressures and a condensing effect at high surface pressures, when compared to a pure DPPG monolayer. This indicates that the permanence of a certain amount of enzyme and the molecular arrangement at the interface helped to stabilize the molecular packing during compression. The isoelectric point of HRP is 7.5 [10], and therefore HRP molecules carry a net positive charge in a Langmuir monolayer with pH 6.3 in the subphase. Hence, interactions between the enzyme and DPPG (a negatively charged lipid) can be a combination of hydrophobic, dipole and electrostatic interactions. With compression, HRP can be expelled

Fig. 1. Surface pressure–area (π – A) isotherms for pure DPPG and mixed HRP–DPPG monolayers with four methods to incorporate HRP (see inset).

from the interface, forming a subsurface below DPPG negative groups, which causes condensation. Also, some solubilization of DPPG molecules may take place. Condensation can be related to a dragging effect of the lipids by the water-soluble protein. Moreover, the liquid-expanded to liquid-condensed (LE–LC) transition was less distinguishable for the mixed monolayer, i.e. a “plateau” was not so well defined.

The data for the second method, or subphase formation, point to an expansion of the isotherm at all areas. In this method the HRP solution was left to stand in the trough for about 10 min. The pre-incorporation of the protein molecules at the free interface could change its conformation, which can be restored when the lipid monolayer is spread. The surface pressure at maximum area did not change from zero during this period. However, at molecular areas lower than $60 \text{ \AA}^2$ an expansion of the DPPG monolayer is observed which can be attributed to the adsorption of the enzyme from the subphase to the air–water interface. This expansion at high surface pressures could be attributed to penetration of HRP at larger areas, with this subphase formation method. After 12 h (result not shown), the monolayer was more condensed than that compressed after ca. 10 min, which reveals a dynamic molecular re-arrangement of the enzyme–lipid molecules at the interface. It is important to emphasize that in the co-spreading method, the use of an organic solution could lead to protein denaturing, but the conformation of the enzyme can be restored [11].

The largest expansion on the DPPG monolayer caused by HRP incorporation occurred with the injection method, which may be due to a larger amount of enzyme being incorporated. In addition, aggregation may have occurred owing to a heterogeneous incorporation of HRP upon injection. The results in Fig. 1 indicate that HRP is incorporated in the monolayer in a stable way, which is inferred from the almost identical isotherms obtained 10 min or 12 h after protein injection under the pre-formed DPPG monolayer. This method is similar to that referred to as “subphase formation” since HRP approaches the monolayer from the subphase. However, the dynamics is entirely different as the approach of HRP appears much more efficient in the injection method. This explains the large difference in the isotherms obtained with the two methods. Interestingly, the injection method is the one that is closer to an *in vivo* situation. Since HRP is not a membrane protein, in a real system one should expect it to approach the membrane from the aqueous compartment—probably driven by diffusion.

When the enzyme was spread on the top of the surface after DPPG spreading, a noticeable LE–LC transition was observed at high surface pressures, and there was also an expansion of the monolayer. This applied to the monolayer compressed 10 min after spreading the two solutions. In contrast, the isotherm for a waiting time of 12 h was less expanded than for the pure DPPG monolayer, especially at high pressures. Such a result is probably due to loss of HRP and DPPG molecules to the subphase, where the latter may have been dragged by the water-soluble HRP.

In conclusion, we observed that the incorporation method of HRP into DPPG monolayers changes strongly the surface pressure–area curve profiles, from which we infer that differ-

Fig. 2. Compressibility factor (C_s^{-1}) vs. surface pressure for pure DPPG and mixed HRP–DPPG monolayers with the four methods to incorporate HRP (see inset).

ent states of molecular arrangement, interaction, geometry and aggregation of the enzyme molecules may be achieved.

In order to investigate changes in the monolayer elasticity caused by HRP incorporation we performed two types of experiment. In the first we used the surface pressure isotherms to estimate the compressibility factor ($C_s^{-1} = -A(\partial\pi/\partial A)$ [12]), which is also referred to as equilibrium surface elasticity. Fig. 2 shows that the maximum C_s^{-1} was ca. 250 mN/m, close to the value for pure DPPG, regardless of the method for incorporation. The dependence on the method to incorporate HRP was not strong, perhaps with the exception of the co-spreading method that yielded lower compressibility factors.

On the basis of the compressibility data shown in Fig. 2, we could not infer whether the elasticity of DPPG is affected strongly by HRP. This prompted us to employ the pendant drop technique to obtain the dynamic dilatational elasticity (E) for pure DPPG and mixed HRP–DPPG monolayers. It should be stressed that the equilibrium value for the dynamic dilatational elasticity modulus, (E), [8] is related to the compressional modulus (C_s^{-1}). For C_s^{-1} we suppose a measurement performed at

equilibrium or at least stationary condition, while E is obtained under non-equilibrium conditions for which dynamic processes are involved. Usually the film elasticity increases with surface pressure because it is related to the packing degree of the monolayer. However this statement is not always true when phase transitions or flexible macromolecules are involved.

The method for the mixed monolayers formed on the drop surface can be related roughly to a combination of the injection and subphase formation methods in a Langmuir trough. As the drop is initially formed by a HRP solution, it corresponds to the “subphase formation” method. After DPPG spreading, the drop is expanded and therefore a new surface is formed, constituted mainly by lipid molecules. HRP molecules will adsorb on the new monolayer from the subphase, which is similar to the injection method, but in a more homogeneous way. The values depicted in Table 1 as E are the complex elasticity modulus as defined by Lucassen and van den Tempel [13], while E_i is the imaginary component. The elasticity for pure HRP solution (0.05 g/L) was 27.2 mN/m at a surface pressure of 12.5 mN/m, indicating some enzyme surface activity. The imaginary elasticity of 1.8 mN/m pointed to some viscous effect. In fact, both pure DPPG and DPPG/HRP monolayers exhibited viscoelastic behaviors. At low surface pressures, e.g. 3 mN/m, the elasticity modulus was higher for the mixed DPPG + HRP monolayer (Table 1). At this low lipid density, incorporation of HRP causes the monolayer to become more rigid, thus increasing E . In contrast, at higher surface pressures, π_i , above 8.0 mN/m, i.e. when the DPPG monolayer is in the liquid-condensed phase, Table 1 shows an elasticity modulus consistently lower for the mixed monolayer. Therefore, the incorporation of HRP causes the monolayer to become more flexible, easier to compress, as is common to other proteins interacting with phospholipid monolayers.

Also shown in Table 1 are the changes in surface pressure caused by incorporation of HRP. This change in pressure decreases with increasing initial surface pressures, which is typical of guest molecules being expelled from the interface as the monolayer pressure increases. The effect is better visualized in Fig. 3 that shows the extrapolation of $\Delta\pi$ to the x -axis, from which we estimate the exclusion surface pressure, π_{exc} [14]. In our case, π_{exc} was ca. 30 mN/m, above which HRP could no longer penetrate in the DPPG monolayer. Usually this surface pressure is related to lateral pressure of cell membranes [15] and occurs for single lipid monolayers because of the high pack-

Fig. 3. Influence of HRP (0.05 g/L) adsorbing at DPPG monolayers on a pendant drop. $\Delta\pi$ is the change in surface pressure. π_{exc} is the exclusion surface pressure.

ing of saturated phospholipids, which prevents incorporation of polypeptides.

4. Conclusions

The surface pressure and dynamic elasticity results have shown that the incorporation of HRP into DPPG monolayers depend on the methodology employed. Maximum incorporation of HRP occurred with the injection method, which is the closest to real situations where drugs are injected in biological environments to interact with membranes. Significantly, it has been argued that for systems involving cell membrane mimicking, the co-spreading method is the best approach since mixtures of proteins and lipids are performed *a priori* [11]. It is therefore important to take into account the incorporation method while analyzing interaction between monolayers and guest molecules. It is important to take into account the kind of biomolecule involved. HRP is a soluble protein and the injection method was experimentally more suitable.

Maximum dynamic elasticity values were found for surface pressures ranging from 20 to 30 mN/m and HRP could no longer penetrate above 30 mN/m in a pre-formed DPPG monolayer. We have thus demonstrated a marked interaction between HRP and DPPG, even at high surface pressures. This interaction can be useful for future applications in biotechnology since hydrogen peroxide sensors can be constructed with Langmuir–Blodgett films.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, IMMP, FINEP, CNPq and Rede Biomat (Brazil).

References

- [1] R.M. Leblanc, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2006) 529–536.
- [2] C.R. Dass, P.F.M. Choong, *Peptides* 27 (2006) 3020–3028.
- [3] A.P. Girad-Egrot, S. Godoy, L.J. Blum, *Adv. Colloid Interface Sci.* 116 (2006) 205–225.

Table 1
Influence of HRP on the dynamic surface elasticity (E) of DPPG monolayers on a phosphate buffer pendant drop

DPPG			DPPG + HRP		
π_i (mN/m)	E (mN/m)	E_i (mN/m)	$\Delta\pi$ (mN/m)	E (mN/m)	E_i (mN/m)
3.0	15.7	0.8	11.4	38.7	1.0
8.0	46.8	5.6	11.0	41.0	3.0
17.0	70.4	12.1	6.8	62.2	10.0
22.0	178.7	15.1	4.9	69.3	11.5

Frequency, 1 Hz; amplitude, 1 mm; $\Delta\pi$ is the change in surface pressure due to HRP incorporation after drop expansion. E_i is the imaginary elasticity.

- [4] H. Brockman, Curr. Opin. Struct. Biol. 9 (1999) 438–443.
- [5] N.C. Veitch, Phytochem. 65 (2004) 249–259.
- [6] J. Tang, J. Jiang, Y. Song, Z. Peng, Z. Wu, S. Dong, E. Wang, Chem. Phys. Lipids 120 (2002) 119–129.
- [7] L. Caseli, D.C. Masui, R.P.M. Furriel, F.A. Leone, M.E.D. Zaniquelli, Colloids Surf. B: Biointerface 46 (2005) 248–254.
- [8] L. Caseli, D.C. Masui, R.P.M. Furriel, F.A. Leone, M.E.D. Zaniquelli, J. Braz. Chem. Soc. 16 (2005) 969–977.
- [9] L. Caseli, M.M. Moraes, V. Zucolotto, M. Ferreira, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, U.P. Rodrigues Filho, O.N. Oliveira Jr., Langmuir 22 (2006) 8501–8508.
- [10] A.C. Maehly, Plant Peroxidase, Methods Enzymol. 2 (1955) 801–813.
- [11] I.P. Sugar, H.L. Brockman, J. Phys. Chem. B 111 (2007) 4073.
- [12] J.T. Davies, E.K. Rideal, Interfacial Phenomena, Academic Press, New York, 1963.
- [13] J. Lucassen, M. van den Tempel, Chem. Eng. Sci. 27 (1972) 1283–1291.
- [14] F. Ronzon, B. Desbat, J.P. Chauvet, B. Roux, Colloid Surf. B: Biointerface 23 (2002) 365–373.
- [15] D. Marsh, Biochim. Biophys. Acta 1286 (2006) 183.

ANEXO – II:

Artigo publicado na *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*

Accepted Manuscript

Enhanced Activity of Horseradish Peroxidase in Langmuir-Blodgett Films of Phospholipids

Thais F. Schmidt, Luciano Caseli, Tapani Viitala, Osvaldo N. Oliveira Jr.

PII: S0005-2736(08)00171-5
DOI: doi: [10.1016/j.bbamem.2008.05.012](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.05.012)
Reference: BBAMEM 79720

To appear in: *BBA - Biomembranes*

Received date: 28 April 2008
Revised date: 25 May 2008
Accepted date: 28 May 2008

Please cite this article as: Thais F. Schmidt, Luciano Caseli, Tapani Viitala, Osvaldo N. Oliveira Jr., Enhanced Activity of Horseradish Peroxidase in Langmuir-Blodgett Films of Phospholipids, *BBA - Biomembranes* (2008), doi: [10.1016/j.bbamem.2008.05.012](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.05.012)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Enhanced Activity of Horseradish Peroxidase in Langmuir-Blodgett Films of
Phospholipids**

Thais F. Schmidt^a, Luciano Caseli^{a,*}, Tapani Viitala^b, Osvaldo N. Oliveira Jr.^a

^a Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

^b KSV Instruments Ltda, Hötläämötie 7, 00380, Helsinki, Finland

- Corresponding author: e-mail: lcaseli@usp.br

Key words: Cell membrane; Enzyme Activity; Horseradish Peroxidase; Langmuir-Blodgett films; Langmuir Monolayers; Air-Water Interface

Summary

The immobilization of enzymes in nanostructured films has potential applications, e.g. in biosensing, for which the activity may not only be preserved, but also enhanced if optimized conditions are identified. Optimization is not straightforward because several requirements must be fulfilled, including a suitable matrix and film-forming technique. In this study, we show that horseradish peroxidase (HRP) has its activity enhanced when immobilized in Langmuir-Blodgett (LB) films, in conjunction with dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG). Incorporation of HRP into a DPPG monolayer at the air-water interface was demonstrated with compression isotherms, and polarization-modulation infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS). From the PM-IRRAS data, we inferred that HRP was not denatured when adsorbed on a pre-formed, low pressure DPPG monolayer. A change in orientation was induced by the phospholipid matrix, with the amide C=O and NH groups from HRP being oriented perpendicular to the surface, parallel to the DPPG acyl chains, i.e. the α -helix was inserted into the monolayer. The mixed DPPG-HRP monolayer could be transferred onto solid supports, to which HRP activity was ca. 23% higher than in solution. The control of molecular architecture and choice of a suitable phospholipid matrix allowed HRP-containing LB films to be used in sensing peroxide.

1. Introduction

Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett (LB) films have been extensively used over the years in connection with biomolecules and/or biologically-relevant molecules [1-4]. Perhaps the initial motivation was the use of phospholipid monolayers as models for a cell membrane [4-9], which in spite of the severe simplifications, provides molecular-level information that cannot otherwise be obtained. This is the case of the interaction between guest molecules, including peptides, proteins, pharmaceutical drugs, and phospholipids at distinct degrees of packing [10-16]. Relatively sophisticated information can be learnt from the experiments with Langmuir monolayers, e.g. the precise location of a drug in relation to the phospholipid molecules and the cooperative response from the monolayer molecules in the presence of minute quantities of drugs [13-15] or peptides [10, 16]. Studies of these interactions have evolved from purely experimental work to molecular dynamics simulations, which are able to explain the effects from pharmaceutical drugs [15] and peptides [16] on the model membranes.

In addition to this interest in mimicking the cell membrane, Langmuir monolayers and LB films have also been used to investigate molecular recognition processes [2, 17] and for biosensing [1, 18]. Indeed, there exist various experimental techniques suitable to identify molecular recognition between film components and guest molecules, either co-spread at the air/water interface [19] or adsorbed from the aqueous subphase [20]. Leblanc [2], for instance, has discussed the “lock and key” interactions and the use of Langmuir monolayers as a model to understand molecular recognition-based biological assemblies. Other examples of molecular recognition in Langmuir monolayers include dynamic chiral recognition of amino acids by a polycholesteryl-substituted cyclen complex [21]. With regard to biosensing, in general

proteins, enzymes in particular, have been immobilized in LB films that serve as sensing units for detecting various analytes. Because of the variety of properties exhibited by the immobilized biomolecules, biosensing may be performed with electrical measurements [22], electrochemical methods [23] and optical measurements [20].

A common feature in the three main uses of monolayers and LB films mentioned above is the need to preserve activity of the biomolecules. Here, advantage can be taken of the molecular control provided by the LB method, in which a suitable orientation of the biomolecule, induced by interactions in the film, may even yield bioactivities that are higher than for the same biomolecule in a homogeneous medium [24]. Since proteins adsorbing at an air/water interface on their own are likely to be denatured, a convenient matrix may be required. For instance, according to Girart-Egrot et al [1], enzyme bioactivity in mixed lipid LB films is preserved because the lipid molecular assembly protects the enzyme, positioning the polypeptide moiety in such a way as to allow the recognition and signal events. In fact, phospholipids have been used as protecting agents for several types of material, not only for membrane cell proteins [25], but also for polysaccharides [26, 27] and synthetic polymers [28].

In this study, we investigate activity preservation and biosensing with Langmuir monolayers and LB films of horseradish peroxidase (HRP). Peroxidases are oxidoreductase enzymes with hydrogen peroxide as electron acceptor [29], whose catalytic properties may be controlled by the microenvironment because the catalytic site contains a heme group that is highly sensitive to its vicinity [30-33]. HRP is extracted from a hard perennial herb, whose roots are important for culinary [29]. In a recent paper [34], we addressed the strategies of incorporation of HRP in lipid films at the air-water interface. Several methods of co-mixing were used, which resulted in different

surface behaviors and micro-heterogeneities. Maximum incorporation of HRP occurred with the “injection method”, i.e. the enzyme solution was injected in the subphase under a pre-formed lipid monolayer, which is the closest to real situations where drugs are injected in biological environments to interact with membranes. An important issue still to be addressed is whether HRP has its conformation preserved at the air-water interface in contact with lipid molecules, and whether HRP can be transferred onto solid supports in the form of LB films. Here we employ surface pressure, surface potential isotherms and Polarization-Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS) to confirm HRP adsorption on a phospholipid film. Significantly, we show that HRP incorporated in LB films transferred with these mixed monolayers exhibits a higher activity than in solution, thus being promising for sensing hydrogen peroxide.

2. Materials and methods

Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) and horseradish peroxidase (HRP) were purchased from Sigma. The other chemicals were of the highest purity available. DPPG solutions (0.5 – 1.0 g/L) in chloroform:methanol (4:1 in volume) were spread on a 0.05 g/L phosphate buffer with ionic strength controlled using 0.01 mol/L NaCl and pH 6.3 in a mini-KSV trough with subphase volume of 220 mL. DPPG was chosen because of the abundance of lipids with glycerol polar heads in natural cell membranes and because it has opposite charge to HRP, which is positively charged under the conditions used in this paper. For producing mixed DPPG-HRP Langmuir monolayers, a total mass of 40 µg of HRP and 75 µg of DPPG was used, corresponding to a lipid:enzyme ratio of 99:1 (mol:mol) in the trough. The surface pressure was measured with the Wilhelmy method, with monolayer compression performed using two barriers

at a 10 cm²/min rate to obtain surface pressure-area isotherms. Surface potential was measured with a Kelvin probe. All measurements were carried out at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ with water purified by a Milli-Q® system (18.2 MΩ.cm and pH 6.3). The method for HRP incorporation is referred to as *injection method* [34], whereby a HRP solution was injected in the subphase after DPPG had been spread.

Polarization-Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS) was performed using a KSV PMI 550 instrument (KSV instrument Ltd, Helsinki, Finland). The Langmuir trough is set up so that the light beam reaches the monolayer at a fixed incidence angle of 80°. At this angle, the intensity is maximum and the noise level is the lowest. A negative band indicates a transition moment oriented preferentially perpendicular to the surface, whereas a positive reflection absorption band indicates a transition moment oriented preferentially in the plane of the surface. The incoming light is continuously modulated between s- and p- polarization at a high frequency, which allows simultaneous measurement of the spectra for the two polarizations. The difference thus provides surface specific information, and the sum provides the reference spectrum. As the spectra are measured simultaneously, the effect of water vapor is largely reduced.

The transfer of the monolayers onto different solid supports (see below) was done at a surface pressure of 30 mN m⁻¹ by emerging the solid substrate perpendicularly to the interface at a dip rate of 5 mm min⁻¹. The formation of LB films was confirmed firstly by analyzing the transfer ratio, and then using fluorescence spectroscopy (Shimadzu FR-5301PC), UV-vis spectroscopy (Hitachi U 2001), PM-IRRAS (KSV instrument Ltd, Helsinki, Finland) and a quartz crystal microbalance (QCM, Stanford Research Systems Inc.). The solid supports used were optical glass for fluorescence and UV-vis measurements, gold for PM-IRRAS, while for QCM we employed an AT-cut

quartz crystal coated with Au, Stanford Research Systems Inc, fundamental frequency of ca. 5 MHz. For determining the enzyme activity, we inserted the solid support in a media containing pyrogallol at 12.8 mmol/L and hydrogen peroxide at 5 mmol/L, and the absorbance was monitored with time at 420 nm, according to the method described elsewhere [35]. All the experiments were repeated at least three times.

3. Results and Discussion

3.1. Monolayers at the air-water interface

Figure 1 shows PM-IRRAS data pointing to the incorporation of HRP injected in a buffer solution onto a lipid-free air-water interface. The main bands appear at 1554 and 1663 cm^{-1} , being assigned respectively to C=O stretching (amide I) and NH bending (amide II), which are typical of polypeptides. The infrared signal increases with time owing to increasing incorporation of HRP, which can also be observed in the adsorption kinetics (inset of Figure 1), where the surface pressure increased from 0 to 10 mN/m within 60 min. The surface pressure stabilized at 11.5-12 mN/m within 90 min, after which there was negligible change in surface pressure and in the infrared bands. A small band assigned to C=O stretching of β -sheets appears at 1619 cm^{-1} , much less intense than the band at 1663 cm^{-1} . The position of the amide I band in α -helical structures should lie between 1656 and 1649 cm^{-1} for native proteins [36]. As the value found here was 1663 cm^{-1} , it is probable that HRP may have been denatured when adsorbed at the air-water interface. This is common for proteins adsorbing at air-water interfaces because the polypeptide chain has to expose hydrophobic moieties towards the air [37]. Also, the strong positive amide I in comparison to amide II band indicates that the helix axis is parallel to the interface [38]. The bands for heme-C=O stretch in

the 1900-1950 cm^{-1} region [39] are very weak, within the dispersion of the data, their analysis being therefore disregarded in this paper.

When HRP adsorbed at a pre-formed DPPG monolayer, the amide bands in Figure 2 also changed with time due to HRP incorporation, as shown in the adsorption kinetics depicted in the inset. However, the bands characteristic of HRP are now inverted in addition to being better resolved in comparison to those for HRP adsorbing at a clean air/water interface. The inversion in the signal of amide bands has already been reported for β -lactoglobulin [40-41]. When the angle of incidence is above the Brewster angle, as in the present case (80°), positive intensities suggest a transition moment preferentially oriented in the plane of the surface, while negative bands indicate a perpendicular orientation [38]. Therefore, the amide C=O and NH groups from HRP are oriented preferentially perpendicular to the membrane surface, parallel to the relatively well-ordered acyl chains of DPPG, i.e. the polypeptide α -helix axis is inserted into the lipid monolayer. In other words, the presence of lipids at the air-water interface induced orientation changes in the HRP adsorbed. Further evidence of changes in orientation of HRP was provided by the splitting of the amide II into two bands (1540 and 1559 cm^{-1}), where the band at 1540 cm^{-1} indicates N-H deformation in β -sheet [42]. Better defined β -sheets were also inferred from the amide I bands centered at 1620 and 1653 cm^{-1} . All these data point to a change in orientation of HRP with phospholipids, with β -sheet structures arising due to the interaction of hydrophobic moieties of HRP with acyl chains of DPPG. Furthermore, HRP has probably not been denatured, as indicated by the main amide I band shifted to 1653 cm^{-1} in the presence of DPPG, which fits in the range reported for non-denatured proteins [43].

The incorporation of HRP was observed for other initial surface pressures of the DPPG monolayer, with the same behavior described above. However, no HRP was

incorporated for surface pressures equal to or higher than 30 mN/m, which was denoted by absence of changes in surface pressure and in the amide bands. The pressure of 30 mN/m corresponds, therefore, to the exclusion surface pressure [34], above which it is no longer possible for HRP to be incorporated from a subphase into a compact monolayer.

In order to infer if the enzyme molecules remain at the interface when subjected to monolayer compression, after being adsorbed on a DPPG monolayer, we performed PM-IRRAS for DPPG alone and with the enzyme incorporated at 0 mN/m. Figure 3 shows the data for DPPG without the enzyme. The surface pressure-area isotherm is typical for DPPG under the conditions used in this work, with a minimum area of 45 Å², and a liquid-condensed state between 50-40 Å². The surface potential-area isotherm shows a critical area of 65 Å² and a maximum potential of about 300 mV. A negative potential of ca. -100mV at large areas appears due to the electric double layer contribution [44], which occurs because the DPPG polar heads are ionized. Panel B in Figure 3 shows the PM-IRRAS spectra for the C-H stretching mode region, dominated by two strong bands at 2917 and 2849 cm⁻¹, ascribed to the antisymmetric and symmetric CH₂ stretching vibrations, respectively. The antisymmetric band is slightly shifted to lower wavenumbers with increasing pressure. According to Dicko et al. [45], this is due to an increased number of *trans* conformers along the lipid chains, which correlates with increasing order upon monolayer compression.

Figure 4 shows that HRP causes the monolayer to expand, with the liquid-expanded to liquid-condensed phase transition occurring at larger areas, consistent with a previous report [34]. The compressibility of the mixed monolayer is also higher than for pure DPPG, making it easier to compress the monolayer, as discussed previously [34]. The surface potential at large areas is positive in the presence of HRP, as the

negative contribution from the double-layer is compensated for with the incorporation of the positively charged HRP. Upon compression the surface potential increases smoothly up to 320 mV. Because the HRP monolayer adsorbed without DPPG and subjected to compression exhibited a surface potential close to 350 mV, the maximum surface potential is an average between the value of pure lipid and HRP.

It seems that HRP is not expelled from the interface even at high surface pressures during compression, for the monolayer remains expanded close to the collapse, which is corroborated by PM-IRRAS spectra. CH₂ bands are centered at 2849 and 2920 cm⁻¹. The higher wavenumber for antisymmetric CH₂ stretching in comparison to pure DPPG indicates the disorder induced by HRP adsorption. For the amide bands, the presence of HRP is noted even at high pressures (40 mN/m). Therefore, if adsorbed onto a DPPG monolayer at zero pressure, HRP is not expelled upon compression, even though it is not able to adsorb from the subphase on a compact (>30 mN/m) monolayer. The inverted peaks when compared to CH₂ indicates again that the amide C=O and NH groups are oriented preferentially perpendicular to the CH₂ stretching mode, and therefore, perpendicular to the interface. Only minor changes are observed when we compare the spectra from Figures 2 and 4, indicating that HRP does not undergo considerable changes in its secondary structure under compression.

3.2 HRP incorporated in LB films

In the last section we mentioned that HRP could adsorb on a lipid-free air/water interface, thus forming a Gibbs monolayer. But the maximum surface pressure achieved was rather low, and the attempts to transfer such a film onto a solid support failed. HRP could be transferred though when mixed with DPPG. Mixed HRP-DPPG LB films were

transferred onto solid supports at a surface pressure of ca. 30 mN/m, with the transfer of the enzyme being confirmed with nanogravimetric and spectroscopic methods. With a QCM, for instance, the mass of HRP-DPPG transferred in one layer was 700 ng, from which 210 ng should be attributed to HRP since the transfer of a neat DPPG layer yielded a mass of 490 ng. Considering the area of the solid support, this mass corresponds to an enzyme density of 230 ng/cm², leading to an area per HRP molecule of 2610 Å², where a molecular weight of 44,000 Da was used for HRP [31]. This value agrees with 2800 Å² determined for HRP on Si wafer by means of fluorescence measurements [46], or 2900 Å² [31], determined by X-ray, suggesting that HRP is adsorbed as a monomolecular layer together with one-layer DPPG LB film. To further predict the orientation of HRP molecules on the solid support, we use the dimensions of an ellipsoid HRP (40, 67 and 117 Å² [47]) and obtain projected areas varying from 2680 to 7840 Å². The lower value fits well to that found here (2610 Å²) and suggests that HRP adsorbed on a DPPG monolayer has its major axis of the ellipsoid oriented perpendicularly to the phospholipids matrix, as depicted in Figure 5.

The scheme in Figure 5 is consistent with the PM-IRRAS results, from which the C=O and NH groups were inferred to be preferentially perpendicular to the water surface. Tang et al. [32] showed that HRP has its conformation changed in contact with DMPC vesicles, to adopt a conformation similar to that in Figure 5, with the dimension of HRP molecule in contact with the liposome surface varying between 40 and 50 Å². Therefore, we may assume that HRP adapts to the lipid environment.

Figure 6 shows the UV-vis spectra for HRP. For the solution, three main bands appear at 210, 275 and 400 nm, attributed respectively to π - π^* and n - π^* transitions of amide groups, and an electronic transition for the heme group in HRP. For the LB film, the π - π^* and n - π^* bands are shifted to lower wavelengths, 205 and 240 nm respectively. The band assigned to the heme group is not apparent in the spectrum for the LB film, probably because of the small mass transferred or due to the re-orientation of the enzyme upon immobilization. Indeed, Huang et al. [33] showed this band to be highly sensitive to hydrophobic environments. In the fluorescence spectra obtained with excitation at 280 nm in Figure 7, emission due to the tryptophan groups occurs at 335 nm, and this band is shifted to ca. 375 nm for the LB film. A similar shift was observed for urease in the presence of phospholipids [20], which is attributed to a re-orientation of the polypeptide moiety and tryptophans induced by immobilization in a phospholipid matrix. The transfer of HRP was confirmed in PM-IRRAS measurements, with the amide II group appearing as a single main signal centered at 1540 cm^{-1} , while the amide I had an α -helix component at 1656 cm^{-1} and a β -sheet component at 1617 cm^{-1} (Figure 8).

3.3. HRP activity

Immobilization of enzymes in solid matrices is a challenge in terms of preservation of catalytic activity. The solid support and way of immobilization should avoid enzyme denaturing and provide an orientation and surface density that maximize catalytic activity [12]. In this context, the microenvironment in which the enzyme is entrapped plays an important role in keeping the conformation and orientation of the polypeptide chain. The geometry of the immobilized enzyme molecule is important not only for the overall conformation in terms of secondary and tertiary structures, which is

essential for the biological functions, but also for a suitable positioning of the catalytic site for access of the substrate (analyte).

Denaturing of enzymes immobilized in solid matrices is common, as the enzymes strive for achieving a lower surface energy, or may not adequately expose their catalytic sites [12, 48]. On the other hand, reports have been made of higher activities for enzymes immobilized under mild conditions [49]. The activity of enzymes immobilized in lipid matrices, for instance, may be higher [20] or lower [12] than in a homogeneous environment. For enzyme entrapped in phospholipid molecules, as in an HRP-DPPG LB film studied here, the close packing of the enzyme adapted to a bio-inspired interface (phospholipids) can lead to a favorable conformation/orientation of the polypeptide structure, which enhances enzyme activity. Tight-packed films may induce a decrease in enzyme activity as reported for glucose oxidase [48]. However, when lipid films are used as adsorption matrix, material permeation through films can be enhanced.

The enzyme activity of HRP immobilized in DPPG LB films, shown in Figure 9, was higher than in solution. Activity was detected using pyrogallol that reacts with hydrogen peroxide forming purporogallin, which absorbs at 420 nm. HRP thus catalyzes this oxydo-reduction reaction. By measuring the increase in absorbance within the first 20 minutes of reaction and using the mass of HRP adsorbed from QCM we obtained an enzyme activity of 1815 ng of purporogallin min^{-1} per mg of HRP. In this estimation, the extinction coefficient was $2470 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ for the product [35]. In contrast, the activity of HRP in a homogeneous medium was 1480 ng of purporogallin min^{-1} per mg of HRP. Also significant was the stability of the enzyme activity measured. For even after 2 weeks with the HRP-DPPG LB film in a buffer solution at 10°C , more than 90 % of the initial enzyme activity was maintained.

HRP immobilized in poly(aniline), or in a poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite, retained 40-70% of the activity when compared to HRP in solution [50]. Naves et al. [47] reported a loss of 50% of activity for HRP immobilized on silicon wafers, which was attributed to the difficult access of the analyte for immobilized HRP. Vianello et al [46] immobilized HRP in several solid supports, and only 5% of the enzyme activity was found in comparison to the free enzyme. As far as LB films are concerned, HRP immobilized from solution in a pre-formed stearic acid LB film had only 30-40% of the free enzyme activity [51].

With regard to cases where HRP activity was reported to be higher than in solution, Gazaryan et al [30] obtained micellar matrices for HRP that enhanced activity due to favorable hydrophobic and dipole interactions. This enhancement was ascribed to a screening of the catalytic site, with the micellar structures inducing superactive conformations and enzyme dimeric structures. Furthermore, interaction of glycosyl parts of HRP with hydrophilic heads of surfactants can induce the enzyme to reach its better conformation-orientation for adequate accessibility of the substrate for catalytic sites. Tang et al. [32] showed that DMPC vesicles with HRP incorporated makes the heme group of HRP in the lipid bilayer to achieve a favorable orientation for exchanging electrons, increasing activity. In other words, the lipid microenvironment facilitated electron transfer, and retained the HRP biological activity.

We may now elaborate on the reasons for an enhanced HRP activity in mixed LB films with DPPG. It seems that the DPPG LB film structure keeps the enzyme in a suitable orientation for access to the heme group involved in the redox reaction. In fact, Gajhede et al. [31] proposed that the substrate access to catalytic site is through an external channel, which has a peripheral hydrophobic layer comprising Phe residues and C18 methyl from the heme group. The inner channel contains an overall positively

charged character due to distal Arg and Phe residues that form a distinctive hydrophobic patch near the exposed heme edge. Also, HRP has an extensive hydrogen-bonding network in the proximal and distal region of the heme. The distal pocket is connected to the proximal side by a hydrogen bonding network. It is believed that hydrophobic interactions cause this channel to open by breaking the H-bonds, thus facilitating the access of the analyte to the active site. The conformation change of HRP might therefore occur because the DPPG membrane affects the hydrogen-bonding network around the heme in HRP. In comparison with the earlier work in which HRP activity was reduced when immobilized in an already-formed, tightly packed LB film [51], we observe that in our case HRP was adsorbed from the subphase at a fluid lipid Langmuir monolayer. This may have driven the adsorption and orientation of HRP molecules to penetrate between hydrophobic chains or simply interact with the polar head groups.

4. Conclusions

We demonstrated that HRP can adsorb onto Langmuir monolayers of DPPG, forming stable monolayers, and having the polypeptide orientation changed, according to PM-IRRAS data. HRP cannot be incorporated at the air-water interface at initial surface pressures above 30 mN/m, but can be retained when high surface pressures are reached upon compressing a mixed enzyme-DPPG monolayer formed at lower initial surface pressures. HRP could be transferred onto solid supports as LB films, as confirmed by QCM, UV-vis, fluorescence and infrared spectroscopy. Enzyme activity could be detected for mixed HRP-DPPG LB films, being higher than in solution. The good control of molecular architecture provided by the LB technique seems essential for

using HRP films in peroxide sensors, whose viability was proven using colorimetric measurements.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP, CNPq, Rede Biomat and IMMP/MCT (Brazil) for the financial assistance.

References

- [1] A. P. Girard-Egrot, S Godoy, L J. Blum, Enzyme association with lipidic Langmuir–Blodgett films: Interests and applications in nanobioscience, *Adv. Colloid Interface Sci.* 116 (2005) 205–225
- [2] R. M. Leblanc, Molecular recognition at Langmuir monolayers, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10 (2006) 529–536
- [3] J. M. Lehn, Perspectives in Supramolecular Chemistry - From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization, *Angew. Chem. –Int. Edit.* 29 (1990) 1304–1319
- [4] H. Brockman, Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999) 438–443
- [5] M. M. Timbs, C. L. Poglitsch, M. L. Pisarchick, M. T. Summer, N. L. Thompson, Binding and mobility of anti-dinitrophenyl monoclonal-antibodies on fluid-like, Langmuir-Blodgett phospholipid monolayers containing dinitrophenyl-conjugated phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1064 (1991) 219–228

- [6] D. Schubert, E. Klappauf, Interactions of band 3-protein from human-erythrocyte membranes with phospholipids monolayers at the air-water interface, *Hoppe-Seylers Zeitschrift Physiol. Chim.* 361 (1980) Pages: 1171-1177
- [7] N. L. Gershfeld, Phospholipid surface bilayers at the air-water interface. 3. Relation between surface bilayer formation and lipid bilayer assembly in cell-membranes, *Biophys. J.* 50 (1986) 457-461
- [8] K. Tajima, N. L. Gershfeld, Phospholipid surface bilayers at the air-water interface. 1. Thermodynamic properties, *Biophys. J.* 47 (1985) 203-209
- [9] L. Ginsberg, N. L. Gershfeld, Phospholipid surface bilayers at the air-water interface II. Water permeability of dimyristoylphosphatidylcholine surface bilayers, *Biophys. J.* 47 (1985) 211-215
- [10] R. Maget-Dana, The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999) 109-140
- [11] L. Caseli, R.G. Oliveira, D.C. Masui, R.P.M Furriel, F.A. Leone, B. Maggio, M. E. D. Zaniquelli, Effect of molecular surface packing on the enzymatic activity modulation of an anchored protein on phospholipid Langmuir monolayers, *Langmuir*, 21 (2005) 4090-4095
- [12] L. Caseli, R. P. M. Furriel, J.F. de Andrade, F.A. Leone, M.E.D. Zaniquelli, Surface density as a significant parameter for the enzymatic activity of two forms of alkaline phosphatase immobilized on phospholipid Langmuir-Blodgett films, *J. Colloid Interface Sci.* 275 (2004) 123-130
- [13] W. Caetano, M. Ferreira, M. Tabak, M.I.M Sanchez, O.N. Oliveira, P. Kruger, M. Schalke, M. Losche M, Cooperativity of phospholipids reorganization upon intraction of dipyridamole with surface monolayer analysis, *Biophys. Chem.* 91 (2001) 21-35

- [14] E. Jablonowska, R. Bilewicz, Interactions of ibuprofen with Langmuir monolayers of membrane lipids, *Thin Solid Films*, 515 (2007) 3962-3966
- [15] M. Pickholz M, O.N. Oliveira, M.S. Skaf, Interactions of chlorpromazine with phospholipid monolayers: Effects of the ionization state of the drug, *Biophys. Chem.* 125 (2007) 425-434
- [16] M. R. Lourenzoni, A.M. Namba, L. Caseli, L. Degre've, M.E.D.Zaniquelli, Study of the interaction of human Defensins with cell membrane models: relationships between structure and biological activity, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 11318-11329
- [17] K. Ariga, J. P. Hill, H. Endo, Developments in Molecular Recognition and Sensing at Interfaces, *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 864-883
- [18] C. Nicolini, E. C. Pechkova, Nanostructured biofilms and biocrystals, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 6 (2006) 2209-2236
- [19] L. Caseli, D.C. Masui, R.P.M. Furriel, F.A. Leone, M.E.D. Zaniquelli, Incorporation conditions guiding the aggregation of a glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchored protein in Langmuir monolayers, *Colloid Surf. B- Biointerfaces*, 46 (2005) 248-254
- [20] L. Caseli, F.N. Crespilho, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, V. Zucolotto, O.N. Oliveira, Using phospholipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films as matrix for urease immobilization, *J. Colloid Interf. Sci.* 319 (2008) 100-108
- [21] T. Michinobu, S. Shinoda, T. Nakanishi, J.P. Hill, K. Fujii, T.N. Player, H. Tsukube, K. Ariga, Mechanical control of enantioselectivity of amino acid recognition by cholesterol-armed cyclen monolayer at the air-water interface, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 14478-14479.
- [22] F. Abdelmalek, M. Shadaram, H. Boushriha, Ellipsometry measurements and impedance spectroscopy on Langmuir-Blodgett membranes on Si/SiO₂ for ion sensitive sensor, *Sens. Actuator B- Chem.* 72 (2001) 208-213

- [23] L. Caseli, M.L. Moraes, V. Zucolotto, M. Ferreira, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, U.P. Rodrigues, O.N. Oliveira, Fabrication of phytic acid sensor based on mixed phytase-lipid Langmuir-Blodgett films, *Langmuir* 22 (2006) 8501-8508
- [24] F. Yin, H.K. Shin, Y.S. Kwon, Direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on gold electrode by Langmuir-Blodgett technique, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 21-29
- [25] L. Caseli L, M.E.D. Zaniquelli, R.P.M. Furriel, F.A. Leone FA, Enzymatic activity of alkaline phosphatase adsorbed on dimyristoylphosphatidic acid Langmuir-Blodgett films, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* 25 (2002) 119-128
- [26] F.J. Pavinatto, L. Caseli, A. Pavinatto, D.S. dos Santos DS, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, H.S. Silva, P.B. Miranda, O.N. de Oliveira, Probing chitosan and phospholipid interactions using Langmuir and Langmuir-Blodgett films as cell membrane models, *Langmuir*, 23 (2007) 7666-7671
- [27] F.J. Pavinatto, A. Pavinatto, L. Caseli, D.S. dos Santos, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, O.N. Oliveira, Interaction of chitosan with cell membrane models at the air-water interface, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1633-1640
- [28] L. Caseli L, T.M. Nobre, D.A.K. Silva, W. Loh, M.E.D. Zaniquelli, Flexibility of the triblock copolymers modulating their penetration and expulsion mechanism in Langmuir monolayers of dihexadecyl phosphoric acid, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* 22 (2001) 309-321
- [29] C. Nigél, Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry* 65 (2004) 249-259
- [30] I.G. Gazaryan, N.L. Klyachko, Y. K. Dulkis, I.V. Ouporov, A.V. Levashov, Formation and properties of dimeric recombinant horseradish peroxidase in a system of reversed micelles, *Biochem. J.* 328 (1997) 643-647

- [31] M. Gajhede, D.J. Schüller, A. Henriksen, A.T. Smith, T.L. Poulos, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nature Struct. Biol.* 4-12 (1997) 1032-1038
- [32] J. Tang, J. Jiang, Y. Song, Z. Peng, Z. Wu, S. Dong, E. Wang, Conformation change of horseradish peroxidase in lipid Membrane, *Chem. Phys. Lipids* 120 (2002) 119-129
- [33] Q. Huang, W. Al-Azzam, K. Griebenow, R. Schweitzer-Stenner, Heme Structural Perturbation of PEG-Modified Horseradish Peroxidase C in Aromatic Organic Solvents Probed by Optical Absorption and Resonance Raman Dispersion Spectroscopy, *Biophys. J.* 84 (2003) 3285–3298
- [34] T.F. Schimdt, L. Caseli, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, O.N. Oliveira, Interaction of horseradish peroxidase with Langmuir monolayers of phospholipids, *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 321 (2008) 206-210
- [35] J. Kanner, J. E. Kinsella, Lipid Deterioration Initiated by Phagocytic Cells in Muscle Foods: Beta-Carotene Destruction by a Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Halide System, *J. Agric. Food Chem.* 3 (1983) 370-376
- [36] I. Cornut, B. Desbat, J.M. Turiat, J. Dufourcq, In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipathic peptides at the air-water interface, *Biophys. J.* 70 (1996) 305-312
- [37] A. Tronin, T. Dubrovsky, S. Dubrovskaya, G. Radicchi, C. Nicolini, Role of protein unfolding in monolayer formation on air-water interface, *Langmuir* 12 (1996) 3272-3275
- [38] D. Blaudez, T. Buffeteau, J.C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pezolet, J. M. Turiat, Polarization-modulated ft-ir spectroscopy of a spread monolayer at the air-water-interface, *Appl.Spectrosc.* 47 (1993) 869-874

- [39] W.J. Ingledew, P.R. Rich, A study of the horseradish peroxidase catalytic site by FTIR spectroscopy, *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005) 886-889
- [40] X. Zhang, N. Ge, T.A. Keiderling, Electrostatic and Hydrophobic Interactions Governing the Interaction and Binding of beta-Lactoglobulin to Membranes, *Biochem.* 46 (2007) 5252-5360
- [41] L. Caseli L, F.J. Pavinatto, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, T. Viitala, O.N. Oliveira, Chitosan as a removing agent of beta-lactoglobulin from membrane models, *Langmuir*. 24 (2008) 4150-4156
- [42] P.J. Lukes, M.C. Petty, J. Yarwood, An infrared study of the incorporation of ion channel forming peptides into langmuir-blodgett-films of phosphatidic-acid, *Langmuir*. 8 (1992) 3043-3050
- [43] I. Cornut, B. Desbat, J.M. Turiot, J. Dufourcq, In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipathic peptides at the air-water interface, *Biophys. J.* 70 (1996) 305-312
- [44] G. P. Borissevitch, M. Tabak, O.N. Oliveira, Interaction of dipyridamole with lipids in mixed Langmuir monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1278 (1996) 12-18
- [45] A. Dicko, H. Bourque, M. Pezolet, Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air-water interface and transferred on solid substrates, *Chem. Phys. Lipids*. 96 (1998) 125-139
- [46] F. Vianello, L. Zennaro, M.L. Di Paolo, A. Rigo, C. Malacarne, M. Scarpa, Preparation, morphological characterization, and activity of thin films of horseradish peroxidase, *Biotechnol. Bioeng.* 68 (2000) 488-495
- [47] A. F. Naves, A.M. Carmona-Ribeiro, D.F.S. Petri, Immobilized Horseradish Peroxidase as a Reusable Catalyst for Emulsion Polymerization, *Langmuir*, 23 (2007) 1981-1987

- [48] T. Nakagawa, M. Kakimoto, T. Miwa, M. Aizawa, New method for fabricating Langmuir-Blodgett films of water-soluble proteins with retained enzyme activity, *Thin Solid Films*, 202 (1991) 151-156
- [49] S. P. George, A. M. Gole, M. Sastry, M.B. Rao, Interaction of xylanase i with a fatty lipid matrix: fabrication, characterization, and enzymatic activity of the enzyme-fatty lipid composite films, *Langmuir* 18 (2002) 9494-9501
- [50] S. Alvarez, S. Manolache, F. Denes, Synthesis of Polyaniline Using Horseradish Peroxidase Immobilized on Plasma-Functionalized Polyethylene Surfaces as Initiator, *J. Appl. Polym. Sci.*, 88 (2003) 369-379
- [51] T.S. Berzina, L. Piras, V.I. Troitsky, Study of horseradish peroxidase activity in alternate-layer Langmuir-Blodgett films, *Thin Solid Films* 327-329 (1998) 621-626

Figure Captions

Figure 1: PM-IRRAS spectra for HRP adsorbing at the air-water interface from a buffer subphase. The adsorption kinetics is shown in the right.

Figure 2: PM-IRRAS spectra for HRP adsorbing at a DPPG monolayer (initial surface pressure of ca. 10 mN/m) from a buffer subphase. The adsorption kinetics is shown in the right.

Figure 3: Compression of DPPG monolayer on buffer-air interface. A: π -A and ΔV -A isotherms. B: PM-IRRAS spectra for CH vibration region.

Figure 4: Compression of a mixed HRP-DPPG monolayer on buffer-air interface. A: π -A and ΔV -A isotherms. B: PM-IRRAS spectra for CH vibration region. C: PM-IRRAS spectra for amide vibration region

Figure 5: Schematic model for HRP deposition on DPPG LB films. HRP is represented as an ellipsoid with major and minor axes as shown on the left. The mixed HRP/DPPG LB film is represented in such a way that the major axis is oriented perpendicularly to the solid support, according to quartz crystal microbalance results. The size of the components was not taken to scale to facilitate visualization.

2

Figure 6: UV-vis spectra for mixed HRP-DPPG LB film. The inset shows the UV-vis spectrum for HRP in solution (1 $\mu\text{g/mL}$).

Figure 7: Emission spectrum for a mixed HRP-DPPG LB film. The inset shows the emission-excitation fluorescence spectra for HRP in solution (1 $\mu\text{g/mL}$).

Figure 8: Infrared spectra for mixed HRP-DPPG LB film.

Figure 9: Enzyme activity for mixed HRP-DPPG LB films using pyrogallol.

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 6

FIGURE 7

FIGURE 8

FIGURE 9