



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



**RAFAEL JÚNIOR DE ANDRADE**

**EQUILÍBRIO, ANÁLISE CONFORMACIONAL E  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE HEMOGLOBINA  
COMPLEXADA A DOPAMINA**

ALFENAS – MG

2020

RAFAEL JÚNIOR DE ANDRADE

**EQUILÍBRIO, ANÁLISE CONFORMACIONAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
HEMOGLOBINA COMPLEXADA A DOPAMINA**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de  
Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira  
da Silva.

ALFENAS – MG  
2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Andrade, Rafael Júnior.

A553e Equilíbrio, análise conformacional e atividade biológica de hemoglobina complexada a dopamina / Rafael Júnior Andrade - Alfenas/MG, 2020.

79 f. : il. –

Orientador: Silva, José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.

Bibliografia.

1. Hemoglobina. 2. Dopamina. 3. Mapas de Interação de Proteínas. 4. Neurônios Dopaminérgicos. I. Silva, José Maurício Schneedorf Ferreira da. II. Título.

CDD-541

**RAFAEL JÚNIOR DE ANDRADE**

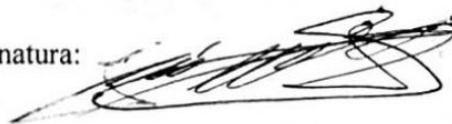
**EQUILÍBRIO, ANÁLISE CONFORMACIONAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA  
DE HEMOGLOBINA COMPLEXADA A DOPAMINA**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Aprovada em: 28 de Fevereiro de 2020

Prof. Dr. José Maurício Schneedorf F. da Silva  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Prof. Dr.<sup>a</sup> Marina Quadrio R. B. Rodrigues  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Giovana de Fátima Lima  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



A meus pais Francisco Carlos de Andrade e Nilda Aparecida Rodrigues de Andrade, que sempre prezaram pela minha formação acadêmica independente das situações.

A meus irmãos Júlio César de Andrade e Heverton Carlos de Andrade, pelo apoio e toda ajuda durante esses anos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Alfenas MG pela grande oportunidade oferecida.

À CAPES, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos técnicos de laboratório que sempre estiveram presentes acompanhando o meu trabalho.

Aos novos e aos amigos de longa data que sempre tiveram ao meu lado dando apoio e me incentivando.

Em especial, agradeço meu orientador José Mauricio por todo o conhecimento compartilhado, toda atenção, paciência e dedicação em me ajudar a buscar soluções para os problemas encontrados ao longo do mestrado.

“A Ciência não tem medo de assumir a sua ignorância, de assumir os limites do que podemos explicar e com isso avançar. Quem se contenta com explicações fechadas e definitivas, ficam com elas. Nós ficamos com eventos cósmicos capazes de mudar o universo.”

Albert Einstein

## RESUMO

A hemoglobina é a principal proteína no transporte de O<sub>2</sub> em vertebrados. Nos últimos anos, estudos tem relatado sua expressão em locais atípicos como em células produtoras de dopamina, neurotransmissor responsável por diversas funções, incluindo a regulação do movimento na substancia negra do encéfalo, sua degeneração seletiva leva à doença de Parkinson sendo o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum que afeta 2 a 3% da população mundial com mais de 65 anos de idade e 3,3 % no Brasil. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo estudar o equilíbrio de interação da dopamina com a hemoglobina e seu possível efeito na resposta biológica desta proteína. Para isto foram realizados ensaios visando compreender e caracterizar termodinâmica e conformacionalmente a interação por espectrofotometria uv-vis, espectrofluorimetria e voltametria cíclica. A formação do complexo foi confirmada pelas três técnicas, revelando um valor médio para K<sub>d</sub> de 273,7 μMol.L<sup>-1</sup>. Análise por Benesi-Hildebrand, Scatchard, Maitra e Hill confirmaram a formação do complexo Hemoglobina-Dopamina na proporção 1:1, também descartando fenômenos de homocooperatividade ou heterogeneidade dos 2 sítios de ligação encontrados para cada monômero proteico. Demais parâmetros termodinâmicos obtidos por fluorimetria apresentaram valores de  $\Delta G^\circ = -15,7 \text{ kJ mol}^{-1}$  a 25°C,  $\Delta H^\circ +8,8 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $\Delta S^\circ +82,2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Isso sugere que a formação do complexo fora espontânea e com modo entropicamente dirigido como predominante, o que foi reforçado pela baixa contribuição de interações iônicas e pontes salinas em ensaios com variação de pH e NaCl. Complementarmente, alterações conformacionais significativas induzidas por DA na Hb foram descartadas por ensaios com sonda hidrofóbica ANS, embora a formação do complexo sugira influenciar negativamente no T<sub>m</sub> de Hb. A dopamina apresentou um efeito negativo na atividade peroxidásica de Hb junto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao, sugerindo que essa interação possa ter impacto nos mecanismos celulares de estresse oxidativo em neurônios dopaminérgicos que expressam Hb.

Palavras-chave: Hemoglobina. Dopamina. Interação Ligante-Proteína. Neurônios Dopaminérgicos.

## ABSTRACT

Hemoglobin is the main protein in the transport of O<sub>2</sub> in vertebrates. In recent years studies have reported its expression in atypical sites such as dopamine-producing cells, a neurotransmitter responsible for several functions, including regulation of movement, in the nigra substance of the brain, its selective degeneration leads to Parkinson's disease, being the second most common neurodegenerative disorder that affects 2 to 3% of the world population over 65 years of age and 3.3% in Brazil. In this sense this project aimed to evaluate the interaction of dopamine with hemoglobin *in vitro* and its plausible effect on the biological response the respiratory pigment. Tests were conducted to understand and characterize thermodynamically and conformationally the interaction of Hb-DA by uv-vis spectrophotometry, spectrofluorimetry and cyclic voltammetry. The complex formation was confirmed by the three techniques, revealing an average value for K<sub>d</sub> of 275 μMol.L<sup>-1</sup>. Analysis by Benesi-Hildebrand, Scatchard, Maitra and Hill confirmed the formation of the Hemoglobin-Dopamine complex in a 1:1 ratio, also discarding homocooperativity or heterogeneity for the 2 binding sites found for each protein monomer. The other thermodynamic parameters obtained by fluorimetry showed values of ΔG° = -15.7 kJ mol<sup>-1</sup> at 25 °C, ΔH° +8.8 kJ mol<sup>-1</sup> and ΔS° +82.2 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>. This suggests a entropically-directed and spontaneous complex formation, which was reinforced by the low contribution of ionic interactions and saline bridges in assays with pH and NaCl changes. Testing the complex formation with ANS as a hydrophobic probe, no mean conformational change could be identified, although a negative influence of DA in Hb Tm seems to be happened. Complimentarily, DA had a negative effect on the peroxidase activity of Hb against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate, thus suggesting that this interaction may have an impact on the cellular mechanisms of oxidative stress in dopaminergic neurons that express Hb in brain.

Keywords: Hemoglobin. Dopamine. Ligand-Binding. Dopaminergic Neurons.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura do grupo catecol presente nos neurotransmissores catecolaminérgicos..... 17
- Figura 2 - Estrutura do neurotransmissor dopamina..... 18
- Figura 3 - Estrutura da hemoglobina humana, composta de duas cadeias  $\alpha$  (em azul) e duas cadeias  $\beta$  (em vermelho), formando um par de dímeros  $\alpha\beta$ , diagrama em fita.....20
- Figura 4 - Estrutura do grupo *heme*. O átomo de ferro tem seis ligações de coordenação: quatro no plano do anel e ligadas ao sistema do anel planar da porfirina..... 21
- Figura 5 - Representação das ligações do íon ferro no centro do grupo *heme* da cadeia  $\alpha$  de Hb com  $O_2$ , e a interação da porfirina com os resíduos de aminoácidos na região..... 22
- Figura 6 - Esquema representativo do mecanismo de peroxidase da Hb com o substrato guaiacol.....25
- Figura 7 - Espectrofotograma de absorção molecular da DA a  $371 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4  $25^\circ\text{C}$ . Inseto: Curva analítica da dopamina obtida em 280 nm na faixa de 53 a  $371 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .....35
- Figura 8 - Espectrofotograma de absorção molecular de Hb a  $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4  $25^\circ\text{C}$ . Inseto: Ampliação da região que compreende de 540 a 580 nm para evidenciar a distinção entre os estados oxi e deoxi do pigmento respiratório..... 36
- Figura 9 - Espectrofotograma de absorção molecular de Hb a  $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , DA a  $159 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e de ambos (Hb-DA) respectivamente nas mesmas proporções anteriores em solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  a pH 7,1 a  $25^\circ\text{C}$ ..... 37
- Figura 10 - Espectrofotograma de absorção molecular de Hb a  $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$  com DA a  $159 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  a pH 7,4 a  $43^\circ\text{C}$  ao longo de 10 min..... 38
- Figura 11 - Influência da temperatura na formação do complexo Hb-DA (Hb a  $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e DA a  $159 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em solução de tampão fosfato  $0,1$

	mol L <sup>-1</sup> , pH 7,1 ao longo de 10 min nas temperaturas de 37, 39, 43, 45 °C, n° = 1.....	39
Figura 12 -	Curva de saturação de DA sobre Hb a 3,7 µmol L <sup>-1</sup> para determinação de K <sub>d</sub> por ajuste não linear por meio da equação 2 dos dados de absorção obtidos a 25°C em tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7,4.....	40
Figura 13 -	Representação de Benesi-Hildebrand (A), Scatchard (B), Hill (C) e Maitra (D) para os dados de interação Hb-DA obtidos a partir da curva de saturação a 37°C em tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7,4.....	42
Figura 14 -	Curva de saturação de DA sobre Mioglobina a 3,7 µmol.L <sup>-1</sup> obtidos a 25°C em tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7,4.....	43
Figura 15 -	Espectro-diferença da formação do complexo Hb a 3,7 µmol L <sup>-1</sup> e DA a 159 µmol L <sup>-1</sup> em pH de 5 a 9 avaliados pelos picos em 215 e 280 nm.....	44
Figura 16 -	Emissão de fluorescência da Hb 7,04 µmol.L <sup>-1</sup> e DA a 481,8 µmol.L <sup>-1</sup> (λ <sub>ex</sub> = 280 nm) em tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7,4 a 25°C.....	46
Figura 17 -	Emissão de fluorescência da DA em diferentes concentrações de Hb.....	48
Figura 18 -	Curva de saturação de Hb sobre DA para determinação de K <sub>d</sub> por ajuste não-linear por meio da equação 2 dos dados de fluorescência obtidos a 25°C em tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7,4.....	49
Figura 19 -	Variação de fluorescência máxima do complexo (F <sub>0</sub> -F) em função da temperatura: 288, 293, 303, 323, 333 K em tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7,4, n° = 1.....	50
Figura 20 -	Isotermas de interação de DA: de 50 a 350 µmol.L <sup>-1</sup> , com Hb 7,04 µmol.L <sup>-1</sup> em distintas temperaturas: 288, 303 e 333 K.....	51
Figura 21 -	Representação de Van't Hoff para a formação do complexo.....	53
Figura 22 -	Figura 22 - Estabilidade termodinâmica de Hb a 7,04 µmol.L <sup>-1</sup> e do complexo em função da temperatura, n° = 1.....	54

Figura 23 - Emissão de fluorescência dos complexos Hb-DA e Hb-ANS.....	56
Figura 24 - Intensidade dos picos em 315 nm na titulação do complexo Hb-ANS nas proporções de 1:1 e 1:10 em concentrações crescentes de DA: de 0,1 a 1,04 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , ( $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ ) $n^\circ = 1$ .....	57
Figura 25 - Titulação de Hb com concentrações crescentes de DA: de 0 a 3,17 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em diferentes concentrações de NaCl: 0 a 1,35 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ....	58
Figura 26 - Voltamogramas cíclicos de dopamina a 318 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,4 em diferentes velocidades de varreduras 1-8: 10 a 400 mV/s. Inseto: relação linear prevista pelo modelo de Randles-Sevcic para sistemas difusionais puros, $n^\circ = 1$ .....	60
Figura 27 - Corrente (A) e potencial formal padrão (B) obtidos para a dopamina a 318 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em diferentes pHs, $n^\circ = 1$ .....	61
Figura 28 - Ciclo voltamogramas de DA 106 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , Hb a 77,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e do complexo Hb-DA.....	62
Figura 29 - Isoterma de interação de DA: de 10 a 252 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a com Hb a 77,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ tal como observado pelo sinal de diferença amperométrica do sistema por voltametria cíclica, $n^\circ = 1$ .....	63
Figura 30 - Atividade peroxidativa de Hb 3,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de peróxido de hidrogênio na faixa de 1,9 a 17,6 mmol.L <sup>-1</sup> em tampão acetato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 5 a 25°C.....	64
Figura 31 - Atividade peroxidativa de Hb-DA em função da concentração de peróxido de hidrogênio na faixa de 1,9 a 17,6 mmol.L <sup>-1</sup> em tampão acetato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 5 a 25°C. Com guaiacol como substrato.....	65
Figura 32 - Esquema representativo da oxidação da dopamina a Melanina.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos resultados obtidos por potencial zeta em solução aquosa pH 7,4 a 25°C.....	45
Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos da interação Hb-DA em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 a 25°C.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANS -	1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato
ATV -	Área tegumentar ventral
BHb -	Hemoglobina bovina (em inglês: <i>Bovine Hemoglobin</i> )
DA-	Dopamina
DLS -	Espalhamento dinâmica de luz ( <i>em inglês: dynamic light scattering</i> )
E° -	Potencial Padrão de eletrodo
Hb -	Hemoglobina
I <sub>p</sub> -	Corrente de pico.
I <sub>pa</sub> -	Corrente de pico anódico.
I <sub>pc</sub> -	Corrente de pico catódico.
K <sub>d</sub> -	Constante de dissociação
mM -	Milimolar
mV -	Milivolt
PC -	Computador Pessoal ( <i>em inglês: Personal Computer</i> )
T <sub>m</sub> -	Melting temperature
SN -	Substância Nigra
SNC -	Sistema Nervoso Central
VC -	Voltametria Cíclica
Y -	Razão do sinal de espectro-diferença
θ -	Razão do sinal de espectro-diferença
ΔA -	Variação de Absorbância
ΔA <sub>máx</sub> -	Variação de Absorbância Máxima
ΔF -	Variação de Fluorescência
λ <sub>ex</sub> -	Comprimento de onda de excitação
μA -	Microampere
μM -	Micromolar
[L] -	Concentração do ligante

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
2.1	NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS.....	17
2.2	HEMOGLOBINA.....	19
3	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	27
4	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1	REAGENTES.....	28
4.2	DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA.....	28
4.3	DETERMINAÇÃO DA DOPAMINA.....	28
4.4	ENSAIO DE INTERAÇÃO DA HEMOGLOBINA COM DOPAMINA.....	29
4.4.1	<b>Espectroscopia de absorção molecular.....</b>	<b>29</b>
4.4.1.1	Espectro diferença da região UV.....	29
4.4.2	<b>Espectrofluorimetria.....</b>	<b>30</b>
4.4.2.1	Titulação da Hb sobre DA.....	30
4.4.2.2	Titulação da DA sobre Hb.....	30
4.5	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA INTERAÇÃO.....	31
4.5.1	<b>Espectro-diferença por Absorção molecular.....</b>	<b>31</b>
4.5.2	<b>Espectrofluorimetria.....</b>	<b>31</b>
4.6	ANALISE CONFORMACIONAL DA INTERAÇÃO DA HEMOGLOBINA COM DOPAMINA.....	32
4.6.1	<b>Sonda hidrofóbica 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS) .....</b>	<b>32</b>
4.7	ATIVIDADE PEROXIDÁSICA DO COMPLEXO HEMOGLOBINA DOPAMINA.....	32
4.8	VOLTAMETRIA CÍCLICA DA INTERAÇÃO.....	33
4.9	POTENCIAL ZETA.....	33
4.10	ANALISE DOS DADOS.....	34
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	35
5.1.1	<b>Dopamina.....</b>	<b>35</b>

5.1.2	<b>Hemoglobina</b> .....	<b>36</b>
<b>5.2</b>	<b>INTERAÇÃO HEMOGLOBINA-DOPAMINA</b> .....	<b>37</b>
5.2.1	<b>Efeito de pH para a formação do complexo Hb-DA</b> .....	<b>44</b>
5.2.2	<b>Potencial zeta</b> .....	<b>45</b>
<b>5.3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO FLUORIMÉTRICA</b> .....	<b>46</b>
5.3.1	<b>Hemoglobina e Dopamina</b> .....	<b>46</b>
5.3.2	<b>Interação Hemoglobina-Dopamina</b> .....	<b>47</b>
<b>5.3.2.1</b>	<b>Titulação de Hemoglobina sobre Dopamina</b> .....	<b>47</b>
<b>5.3.2.2</b>	<b>Titulação de Dopamina sobre Hemoglobina</b> .....	<b>47</b>
5.3.3	<b>Parâmetros termodinâmicos da formação do complexo</b> .....	<b>51</b>
5.3.4	<b>Estabilidade da Hemoglobina complexada a Dopamina</b> .....	<b>53</b>
5.3.5	<b>Análise conformacional da interação de Hemoglobina-Dopamina</b> .....	<b>54</b>
5.3.6	<b>Efeito salino</b> .....	<b>58</b>
<b>5.4</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA</b> .....	<b>59</b>
5.4.1	<b>Caracterização eletroquímica de DA e variação de pH</b> .....	<b>59</b>
5.4.2	<b>Interação Hemoglobina-Dopamina</b> .....	<b>62</b>
<b>5.5</b>	<b>ATIVIDADE PEROXIDÁSICA DA HEMOGLOBINA E DO COMPLEXO HEMOGLOBINA- DOPAMINA</b> .....	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>75</b>
	<b>ANEXOS A</b> .....	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A etiologia de doenças neurodegenerativas como o Parkinson ainda não é conhecida, entretanto se sabe que a diminuição de dopamina no sistema nervoso central (SNC) é característico. A dopamina (DA) pertence à família dos neurotransmissores catecolaminérgicos, sendo responsável por funções como regular o movimento, atuar na cognição, nas emoções e dentre outras. Entretanto, o que leva a essa diminuição ainda é muito discutido, levando em consideração a instabilidade molecular da dopamina em comparação com outros neurotransmissores de sua família, bem como seu potencial de oxirredução sobre metabólitos e biopolímeros [1]. Os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos que são as principais fontes de dopamina do cérebro são divididos em dois grupos de células: A9 neurônios da substância nigra (SN) e A10 na área tegumentar ventral (ATV). Nos últimos anos estudos têm mostrado a expressão de hemoglobinas ou cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das proteínas em locais atípicos, como nas células dopaminérgicas A9 [2].

Nos vertebrados todo o oxigênio é transportado pela hemoglobina (Hb), uma proteína presente nos eritrócitos do sangue. Sendo responsável por transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos e transportar parte do dióxido de carbono no sentido contrário. Apresenta uma facilidade significativa de se ligar e desligar facilmente ao oxigênio, dependendo de sua pressão nos tecidos, bem como temperatura e pH. A Hb é uma proteína tetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ), tendo duas cadeias  $\alpha$  idênticas e duas cadeias  $\beta$  também idênticas. Cada uma contém um grupo prostético *heme*, ligado de forma covalente. O *heme* é composto de uma parte orgânica e um átomo de ferro no estado ferroso [ $\text{Fe}^{2+}$ ] ao centro, ligado a quatro nitrogênios da estrutura. O átomo ainda apresenta dois sítios de ligações adicionais de cada lado do plano do *heme*, sendo uma das ligações ocupadas com um resíduo de histidina da proteína e o outro para ligação ao oxigênio ( $\text{O}_2$ ) [3].

Este grupo *heme* confere às hemoglobinas uma semelhança com os centros ativos das peroxidases, atraindo atenção de diversos estudiosos por ser um bom modelo de estudo da atividade catalítica dessas enzimas. As peroxidases constituem um grupo de enzimas que catalisa a oxidação de uma variedade de moléculas utilizando o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com a hemoglobina resulta na formação de intermediários altamente reativos que danificam células e tecidos [4].

Partindo deste ponto, o presente trabalho questiona a possibilidade da interação de hemoglobina com a dopamina, bem como o equilíbrio envolvido e os efeitos do complexo formado. Com base neste questionamento e no conhecimento da facilidade de interação de hemoglobina com outras moléculas, sua interação com a dopamina resulta na formação de um complexo cuja função biológica da proteína é afetada.

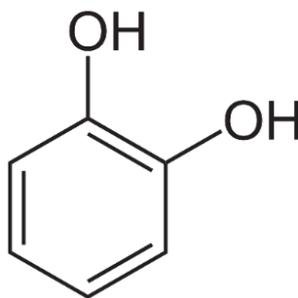
A literatura carece de estudos a respeito da interação de hemoglobina com neurotransmissores, em especial dopaminérgicos, desta forma há uma necessidade de compreensão das relações entre hemoglobina e dopamina, bem como seus efeitos biológicos associados a eventos neuro, fisio ou patológicos, uma vez que ainda é desconhecido a função desta proteína em células A9. Assim, a avaliação da formação do complexo de hemoglobina-dopamina, bem como seus efeitos podem auxiliar numa melhor compreensão da origem de respostas ao estresse oxidativo, alterações no metabolismo celular, bem como de doenças neurodegenerativas. Para este fim, foram utilizadas técnicas de espectrofotometria de uv-vis, espectrofluorimetria, potencial zeta e voltametria cíclica para caracterizar a interação bem como avaliar a atividade biológica resultante.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS

Pertencentes a família dos neurônios catecolaminérgicos, que tem o aminoácido tirosina como precursor de três distintos neurotransmissores aminérgicos e que contém a estrutura química denominada catecol (figura 1), estes neurotransmissores são coletivamente chamada de catecolaminas. Os neurotransmissores catecolaminérgicos são a dopamina, a noradrenalina e adrenalina, também conhecida como epinefrina. São encontrados em regiões do sistema nervoso envolvidas no humor, na atenção e nas funções viscerais [5]. Os neurônios dopaminérgicos são um grupo de células anatômica e funcionalmente heterogêneo envolvido em uma ampla gama de atividades e comportamentos de redes neuronais. Dentre elas, os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos são a principal fonte de dopamina no cérebro. Apresentam dois grupos principais de células projetadas: os neurônios A9 da substância negra (SN) e as células A10 da área tegumentar ventral (ATV) [5, 6].

Figura 1 - Estrutura do grupo catecol presente nos neurotransmissores catecolaminérgicos.



Fonte: ACD/ChemSketch, 2019

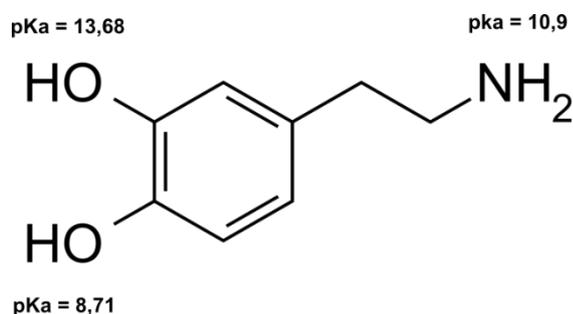
Os neurônios A9 formam a via nigroestriatal e estão envolvidos na regulação dos movimentos voluntários e dos reflexos posturais. Sua degeneração seletiva leva à doença de Parkinson sendo o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum que afeta 2 a 3% da população mundial e 3,3 % no Brasil com mais de 65 anos de idade [7, 8]. Acredita-se que a perda de sinapses nos neurônios dopaminérgicos seja a causa primária para a interrupção da capacidade de controlar os movimentos [9]. As células A10 constituem a

via mesocorticolímbica, desempenhando um papel fundamental na recompensa e atenção. Sua função anormal tem sido associada à esquizofrenia, déficit de atenção e dependência, enquanto a dopamina é relativamente reduzida em Parkinson [10, 11].

A dopamina (3, 4-di-hidroxifenetilamina; DA) representado na figura 2, é um neurotransmissor derivado do aminoácido tirosina, pertencente à família das catecolaminas, e desempenha vários papéis importantes no cérebro e no corpo. Sua concentração no plasma sanguíneo é menor que  $0,7 \text{ nmol.L}^{-1}$  [12]. Os receptores de dopamina são subdivididos de acordo com a localização no cérebro e função. O cérebro contém várias vias dopaminérgicas, estando envolvidas no movimento (via nigroestriatal) e comportamento motivador (via mesolímbica), constituindo-se também um componente central dos eixos neuroendócrinos (hipotálamo). A via mesolímbica desempenha um papel importante no sistema de comportamento motivado por recompensa.

A maioria das recompensas aumentam o nível de dopamina no cérebro, e muitas drogas viciantes aumentam a atividade neuronal da dopamina. A dopamina também está envolvida na aprendizagem, humor, emoções, cognição e memória. É precursora natural da adrenalina, noradrenalina e outras catecolaminas com função estimulante do sistema nervoso central [1, 5, 6]. A desregulação da dopamina está relacionada a transtornos neuropsiquiátricos como a doença de Parkinson [11, 13], no qual ocorre escassez na via dopaminérgica nigroestriatal, e na esquizofrenia, no qual ocorre excesso de dopamina na via dopaminérgica no mesolímbico e escassez na via mesocortical [11].

**Figura 2** - Estrutura do neurotransmissor dopamina.



Fonte: ACD/ChemSketch, 2019

A perda de dopamina pode desencadear alterações morfológicas secundárias proeminentes, como a redução da densidade das espinhas dendríticas, como também mudanças na densidade e sensibilidade dos receptores de dopamina [14]. As razões para

a perda de dopamina são atribuídas à sua instabilidade molecular. Diversos autores [15, 16, 17, 18] investigam algumas causas possíveis da instabilidade da dopamina, dentre essas causas as anomalias próprias de neurônios dopaminérgicos, a degradação da dopamina por monoamina-oxidase A ou auto-oxidação, e a reação com o aminoácido cisteína.

Mudanças no metabolismo da DA podem conduzir a elevadas concentrações deste neurotransmissor, assim acelerar a sua auto-oxidação no interior das células [19]. *In vivo* a auto-oxidação da dopamina produz: DA-quinonas, radicais superóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, sendo estes extremamente citotóxicos [1, 20]. A estrutura do catecol contribui para a alta ativação oxidativa da dopamina. Além disso, os terminais N na estrutura da dopamina podem representar outro ponto reativo; entretanto, pouca evidência experimental prova isso [14].

A molécula da dopamina é conhecida por possuir propriedades únicas que tornam mais provável a formação de metabólitos reativos do que outros neurotransmissores de mesma classe. Neste sentido, possui uma taxa mais elevada de oxidação para uma quinona deficiente em elétrons e uma taxa mais lenta de ciclização interna (e, portanto, desintoxicação) da estrutura quinona em comparação com outras catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) [1].

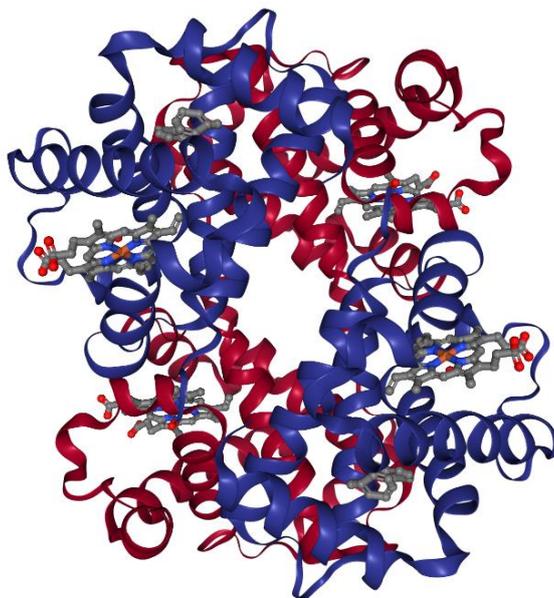
## 2.2 HEMOGLOBINA

A maior parte de todo o oxigênio em mamíferos é transportada pela hemoglobina. A hemoglobina é a principal proteína solúvel que se encontra presente nos eritrócitos do sangue de diversos organismos (representando cerca de 75% da proteína total do sangue), cuja capacidade de ligação a gases já foi descrita por vários autores [4,21]. É responsável pelo transporte do oxigênio, dos pulmões até aos tecidos e parte do dióxido de carbono no sentido inverso [4]. Sua versatilidade reside na capacidade para se ligar e desligar facilmente ao O<sub>2</sub>, conforme a variação de pressão deste gás nos tecidos [21]. A coordenação do oxigênio é mediada pela estrutura tetramérica  $\alpha_2\beta_2$  pela ligação do mesmo ao átomo de ferro no grupo *heme*. Essa estrutura é essencial para a sua função no sangue [2].

Em humanos podemos encontrar diversos tipos de hemoglobina conforme o estágio de desenvolvimento. As mais relatadas são a hemoglobina F ( $\alpha_2\gamma_2$ ) encontrada na fase fetal, e a hemoglobina A ( $\alpha_2\beta_2$ ) em adultos, sendo esta o tipo mais comum, correspondendo a 95% da hemoglobina total. A hemoglobina pertence à família das globinas, que constitui uma ampla família de proteínas, todas semelhantes no que diz respeito as estruturas primária e terciária. As globinas são comumente encontradas em todas as classes dos eucariotos, e até mesmo em algumas bactérias. A maioria atua no armazenamento ou no transporte de oxigênio, embora algumas tenham um papel de sensores de oxigênio, óxido nítrico ou monóxido de carbono [3].

A hemoglobina constitui um tetrâmero formado por duas cadeias  $\alpha$  idênticas e duas cadeias  $\beta$  idênticas, estando presente desde *Staphylococcus* até *Homo sapiens* (figura 3). A hemoglobina humana possui alta homologia estrutural em relação à bovina, objeto de estudo deste trabalho [22]. As cadeias  $\alpha$  possuem 141 aminoácidos e as cadeias  $\beta$  146 aminoácidos. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo *heme*, ligado covalentemente [4]. As quatro unidades polipeptídicas estão ligadas entre si por ligações não covalentes, ou seja, ligações fracas do tipo ligações de van der Waals.

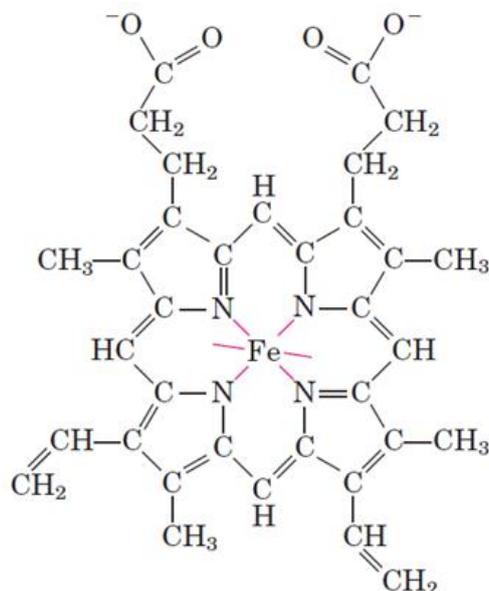
Figura 3 - Estrutura da hemoglobina humana, composta de duas cadeias  $\alpha$  (em azul) e duas cadeias  $\beta$  (em Vermelho), formando um par de dímeros  $\alpha\beta$ , diagrama em fita.



Fonte: HERZIK, 2019. PDB ID 2DN1.

O oxigênio molecular é pouco solúvel em soluções aquosas; evolucionariamente, seu transporte para os tecidos é otimizado pela presença de átomos metálicos em hemoglobinas, sobretudo do ferro, sendo incorporado em um grupo prostético chamado de *heme*, ou porfirina ligados à proteína [3]. As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos das proteínas não são adaptadas para a ligação reversível de moléculas de oxigênio, e o ferro livre promove a formação de espécies de oxigênio altamente reativas, que podem causar danos em diversas macromoléculas no interior das células. Desta forma, o grupo *heme* representado na figura 4, que confere a estas proteínas, bem como ao sangue e aos músculos sua coloração característica, é constituído por uma parte orgânica e um átomo de ferro no estado ferroso [ $\text{Fe}^{2+}$ ]. O componente orgânico, denominado protoporfirina IX, é constituído de quatro anéis pirrólicos ligados, formando um anel tetrapirrólico. São ligados dois grupos metila, dois grupos vinila e duas cadeias laterais de propionato [21].

Figura 4 - Estrutura do grupo *heme*. O átomo de ferro tem seis ligações de coordenação: quatro no plano do anel e ligadas ao sistema do anel planar da porfirina.

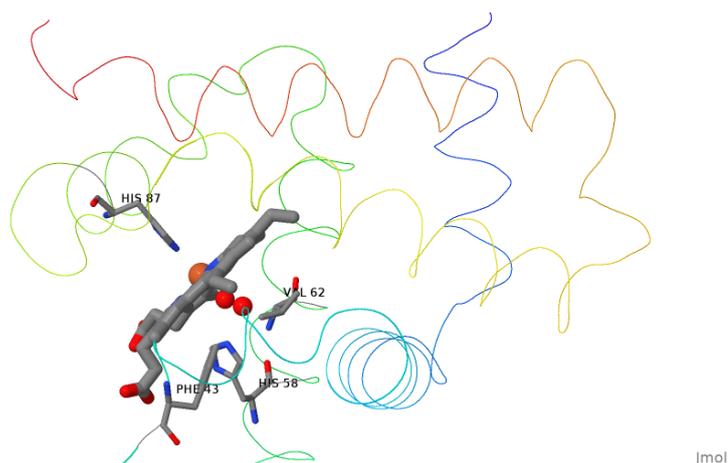


Fonte: NELSON ; COX, 2018.

A sua fórmula molecular é  $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{FeN}_4\text{O}_4$  e tem uma massa molecular de 616,487 g/mol [4]. A interação do átomo de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) do grupo heme dá-se por seis ligantes, quatro dos quais os nitrogênios tetrapirrólicos do grupo prostético da Hb, um do nitrogênio do anel imidazólico da histidina proximal His87 e o sexto ligante o oxigênio molecular entre o átomo de Fe e a cadeia lateral da histidina distal His58. (figura 5).

Complementarmente, Val62 e Phe43 contribuem para o ambiente hidrofóbico de interação com o oxigênio molecular. No estado desoxigenado, o átomo de Fe do grupo heme fica apenas pentacoordenado [23].

Figura 5 - Representação das ligações do íon ferro no centro do grupo *heme* da cadeia  $\alpha$  de Hb com  $O_2$ , e a interação da porfirina com os resíduos de aminoácidos na região.



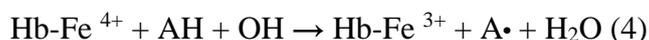
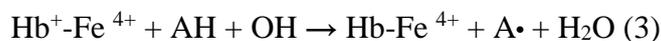
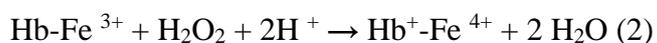
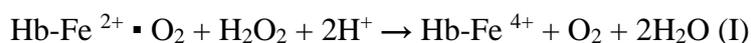
Fonte: SCHENEEDORF FS, 2019.

Quando o oxigênio se liga, as propriedades eletrônicas do ferro são alteradas; isso leva à mudança da coloração de roxo-escuro do sangue venoso pobre em oxigênio, para o vermelho-brilhante do sangue arterial rico em oxigênio [3]. A hemoglobina deve capturar o oxigênio tão eficiente quanto o deve liberar facilmente nos outros tecidos em condições fisiológicas ótimas. A ligação do oxigênio na hemoglobina se dá de forma cooperativa, ou seja, uma ligação cooperativa ocorrerá quando uma ligação de uma molécula de oxigênio facilitar a ligação da próxima molécula [22]. *In vivo*, a hemoglobina pode apresentar duas estruturas quaternárias conformacionais distintas. Uma é a estrutura T (Tensa), característica da forma desoxi-Hb (não ligada), possuindo baixa afinidade ao oxigênio; a outra é a estrutura R (Relaxada), característica da forma Oxi-Hb (4 moléculas de oxigênio ligadas) e tem alta afinidade ao oxigênio [3, 4, 21]. Um equilíbrio entre T e R é estabelecido no interior dos eritrócitos, sendo a forma parcialmente ligada encontrada em baixas concentrações [21]. Moléculas pequenas, como o monóxido de carbono (CO) coordenam com o ferro do *heme* com maior afinidade do que o  $O_2$ . Quando uma molécula de CO está ligada, o  $O_2$  é excluído. A grande afinidade do monóxido de carbono com a hemoglobina prejudica o transporte de oxigênio, levando a uma série de efeitos negativos

ao corpo humano, os quais variam desde sutis alterações no comportamento até a morte dependendo da concentração [24].

Sendo a hemoglobina uma *heme* proteína, ela compartilha muitas semelhanças químicas, físicas e espectroscópicas com os centros ativos das peroxidases [25]. Tornando-se objeto de interesse de vários investigadores, uma vez que constitui um bom modelo para o estudo da atividade catalítica de peroxidase de várias *heme* proteínas pois: 1) possui um tamanho molecular relativamente pequeno quando comparado com a maior parte das proteínas; 2) apresenta o mesmo grupo prostético *heme* (centro redox e eletroativo da proteína); e 3) pode reagir *in vivo* com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido nas células em vários processos metabólicos [4, 25]. O peróxido de hidrogênio é um composto de reatividade considerável que está envolvido na disseminação de lesões celulares em vários casos patológicos.

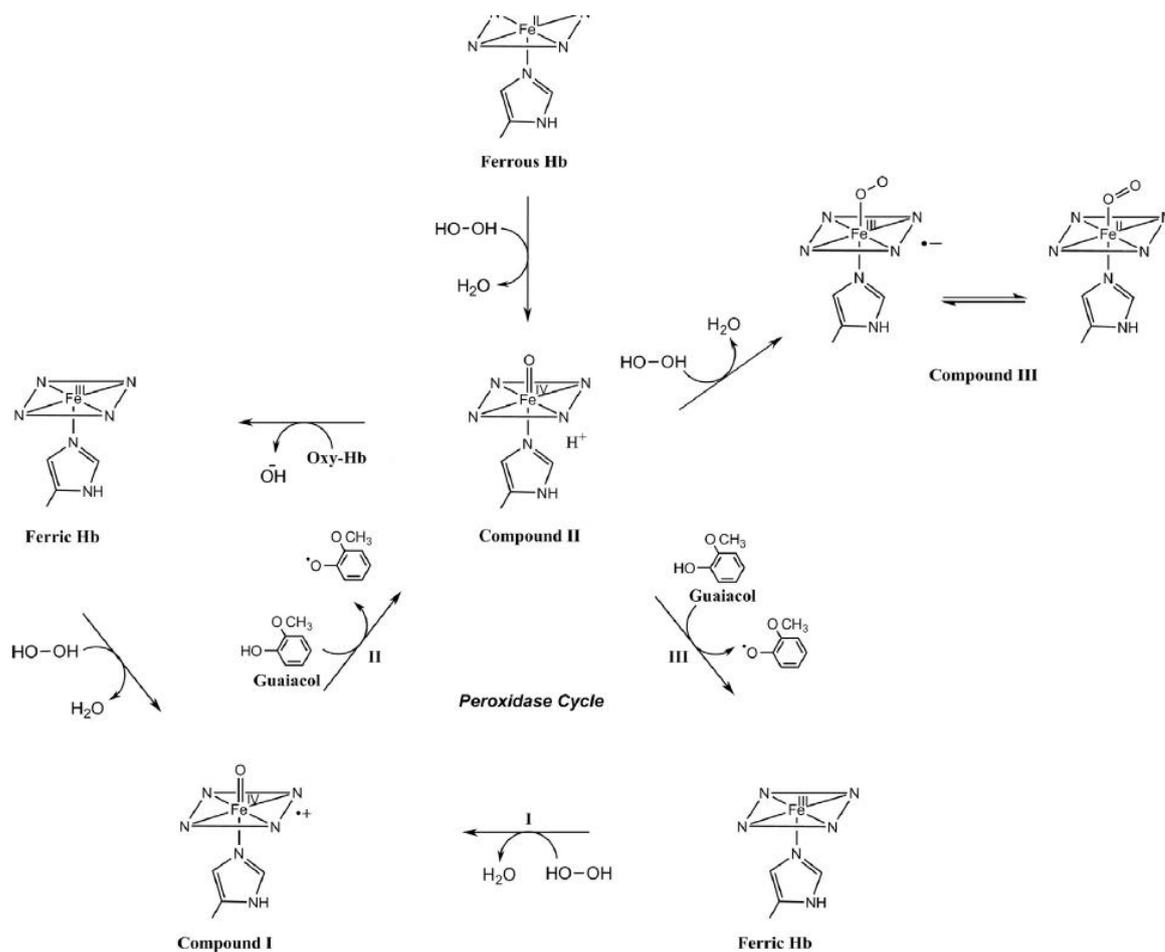
As peroxidases são um grupo de enzimas oxirredutases que catalisam a oxidação de uma ampla variedade de moléculas utilizando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante [24]. Acredita-se que o mecanismo pelo qual a hemoglobina exerça sua atividade peroxidativa seja bastante semelhante ao das peroxidases (sequência de reações de I a 6), em que o peróxido de hidrogênio reage primeiro com a enzima nativa e retira dois elétrons, gerando uma espécie intermediária comumente referida como Composto I. Composto I depois reage com um substrato adequado e retira dois elétrons do substrato, o que pode ser feito de cada vez. A forma intermediária da enzima que absorveu um elétron de uma molécula de substrato é denominada Composto II. No Composto I e no Composto II, o ferro heme está presente na forma de ferril, isto é, carrega quatro cargas positivas [26].



Onde Hb-Fe<sup>2+</sup> · O<sub>2</sub> e Hb-Fe<sup>3+</sup> representam oxihemoglobina e metahemoglobina respectivamente, Hb<sup>+</sup>-Fe<sup>4+</sup> e Hb-Fe<sup>4+</sup> representam duas formas de hemoglobina ferril e AH representa diferentes substratos e AH representa diferentes substratos que podem sofrer oxidações de um elétron para formar o radical A•.

De acordo com Celia [27], o mecanismo de reação da Hb com guaiacol como substrato pode ocorrer de duas maneiras, na primeira o peróxido de hidrogênio reage com a forma ferrosa nativa da Hb para gerar a forma oxi-ferril ( $\text{Hb}^+-\text{Fe}^{4+}$ ) (composto II), que reage sequencialmente com outra molécula de Hb ferrosa para produzir a forma férrica-Hb ( $\text{Hb}-\text{Fe}^{3+}$ ) (figura 6). Esse caminho corresponde à oxidação da Hb ferrosa nativa. Na segunda, na presença de guaiacol, a reação segue um mecanismo cíclico de peroxidase, envolvendo a formação de dois intermediários proteicos, a Hb ( $\text{Hb}-\text{Fe}^{3+}$ ) e o composto I ( $\text{Hb}-\text{Fe}^{4+}$ ). Nesta reação, a oxidação dos centros *heme* férrico e dos anéis de porfirina produz dois elétrons que são usados para reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$  na água. O composto I reage com moléculas de guaiacol, doadores de um elétron, reduzindo de volta para a Hb ferril via composto II. No entanto, na ausência de quantidades suficientes de guaiacol, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode atuar como um doador de elétrons (co-substrato), levando à formação (a partir do composto II) da forma oxi-ferrosa ou dos complexos super-férrico-superóxido (composto III). A competição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com guaiacol pela oxidação da Hb produz um sistema irreversivelmente inativado, inibindo ou diminuindo a atividade peroxidase da hemoglobina. O excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  também pode oxidar a hemoglobina ou o *heme* e produzir a liberação de ferro [28].

Figura 6 - Esquema representativo do mecanismo de peroxidase da Hb com o substrato guaiacol.



Fonte: Adaptado de CARUSO, 2016.

Tipicamente, as hemoglobinas são expressas nos eritrócitos, que em condições normais são pequenos discos bicôncavos (6 a 9 mm de diâmetro), formados a partir de células-tronco precursoras, chamadas de hemocitoblastos na medula óssea. No processo de maturação, a célula-tronco produz células-filhas que produzem grandes quantidades de Hb, cerca de 640 milhões dessas proteínas [24], perdendo em seguida suas organelas intracelulares – núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Entretanto, estudos [2, 6, 29] tem mostrado a expressão da hemoglobina em locais atípicos. Transcritos para cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina, bem como imunorreatividade à hemoglobina, foram mostrados em neurônios dopaminérgicos [2].

No cérebro, a hemoglobina foi detectada em neurônios dopaminérgicos A9 mesencefálicos, cuja degeneração seletiva é a principal causa da doença de Parkinson [30]. É importante ressaltar que níveis alterados de Hb foram observados em doenças neurodegenerativas após o óbito, tanto de camundongos, ratos e humanos. A expressão

de Hb é aumentada em neurônios piramidais no córtex de pacientes com esclerose múltipla, enquanto está diminuída em neurônios de cérebros de doença de Alzheimer e Parkinson. Níveis elevados de Hb podem ser encontrados em placas amilóides extracelulares e cérebros envelhecidos, possivelmente devido à comprometimento da barreira hematoencefálica [2]. A função específica da hemoglobina nos neurônios permanece obscura. No entanto, a hemoglobina regula os genes envolvidos na homeostase do oxigênio e na fosforilação oxidativa, ligando a expressão da hemoglobina à atividade mitocondrial [6, 31]. No contexto dos neurônios dopaminérgicos A9 mesencefálicos, isto é muito importante, uma vez que estas células expressam especificamente genes envolvidos no metabolismo energético e na função mitocondrial, e apresentam uma elevada taxa metabólica e estresse oxidativo [2].

Desta forma, como não há estudos da interação da presente proteína com a dopamina bem como caracterização dos produtos desta interação, se faz necessário para que se possa compreender melhor a origem de doenças neurodegenerativas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o equilíbrio de interação de dopamina com hemoglobina e o possível efeito da dopamina na resposta biológica desta proteína.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Monitorar a interação de dopamina com Hb por técnicas espectroscópicas (absorção molecular e fluorimetria) e eletroquímicas (voltametria).
- ✓ Determinar os parâmetros termodinâmicos da interação;
- ✓ Investigar os mecanismos plausíveis da formação do complexo (simples, cooperativo, heterogêneo, entre outros);
- ✓ Avaliar o potencial Zeta de carga superficial da solução do ligante, da proteína e do complexo
- ✓ Avaliar conformacionalmente o complexo por sonda fluorescente Ácido 8-anilino naftaleno-1-sulfonato (ANS);
- ✓ Avaliar a atividade peroxidásica de Hb e do complexo;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 REAGENTES

Hemoglobina bovina (BHb), dopamina (DA) e o guaiacol foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, E.U.A.), sem purificação adicional. Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico PA. Água bidestilada foi utilizada no preparo das soluções. As escolhas das concentrações dos reagentes foram acertadas com base em ensaios preliminares.

### 4.2 DETERMINAÇÃO DE HEMOGLOBINA.

Para a determinação espectrofotométrica da hemoglobina, uma solução estoque de concentração  $77,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4 foi preparada. A partir desta, novas soluções de concentrações na faixa de  $0,387 - 3,096 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato foram preparadas, onde os volumes finais foram iguais a 1 mL. As determinações das concentrações foram realizadas em 405 nm para a obtenção da curva analítica e o coeficiente de absorvidade molar seguindo a lei de Beer com 1 cm de caminho óptico, em cubeta de quartzo.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA.

Para a determinação espectrofotométrica da dopamina foi preparada uma solução estoque na concentração de  $5,3 \text{ mmol.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4. A partir desta solução estoque, foram preparadas soluções de diferentes concentrações na faixa de  $53 - 371 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato, onde os volumes finais foram iguais a 1 mL. As determinações das concentrações foram realizadas em 280 nm para a obtenção da curva

analítica e o coeficiente de absorvidade molar seguindo a lei de Beer com 1 cm de caminho óptico, e em cubeta de quartzo.

#### 4.4 ENSAIO DE INTERAÇÃO DA HEMOGLOBINA COM A DOPAMINA.

##### 4.4.1 Espectroscopia de absorção molecular

O ensaio de complexação foi realizado com diferentes volumes de dopamina na faixa de 10-200  $\mu\text{L}$  a partir da solução estoque de  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4 e um volume fixo de 50  $\mu\text{L}$  de hemoglobina da solução estoque de concentração  $77,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, onde os volumes finais foram de 1,05 mL completados com tampão. A reação foi conduzida a  $37^\circ\text{C}$ , por auxílio de um banho ultratermostatizado (Quimis-Q-242, SP, BR). A varredura espectral deu-se na faixa de 200-500 nm em espectrofotômetro Libra S22 UV/Vis (Biochrom Ltda, St . Albans, UK), utilizando cubetas de quartzo, tendo como branco a solução tampão.

##### 4.4.1.1 Espectro-diferença da região UV.

A variação de absorbância foi obtida através da subtração da absorbância da proteína livre e a absorbância após a proteína ligada (equação 1) [32, 33]. Primeiramente foi realizado branco com 1 mL de tampão, na sequência foi acionado 50  $\mu\text{L}$  de Hb e obtido espectro. Um outro branco com tampão é realizado, seguida da leitura de diferentes volumes de DA, sempre atendendo para um volume final de 1 mL de solução. Estas soluções de tampão-DA cujos espectros já foram obtidos, foi utilizado para obter um novo branco, seguida da adição de 50  $\mu\text{L}$  de hemoglobina. Um gráfico de  $\Delta A$  por concentração de DA foi construído.

$$\Delta A = A_{\text{Hb}} - A_{\text{Hb-DA}} \quad (1)$$

Onde  $\Delta A$  representa a variação de absorvância,  $A_{\text{Hb}}$  é absorvância da hemoglobina livre e  $A_{\text{Hb-DA}}$  é a absorvância após adição de hemoglobina à solução de dopamina utilizada como zero.

#### 4.4.2 Espectrofluorimetria

##### 4.4.2.1 Titulação de Hb sobre DA

Para a complexação do ligante com a proteína foi utilizado solução estoque de dopamina  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  e hemoglobina  $77,4 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4. A titulação de DA com Hb foi conduzida de duas maneiras distintas, em tubos e titulação seriada. Para a primeira, 7 tubos de ensaios com volume fixo de DA foram preparados e em cada um posteriormente foi adicionado alíquotas crescentes de Hb, seguindo-se suas leituras emissivas. Na segunda, sobre uma única solução de DA foi adicionado alíquotas crescentes de Hb.

##### 4.4.2.2 Titulação de DA sobre Hb

A partir de volumes conhecidos das soluções estoque dos reagentes o ensaio foi elaborado variando-se o volume de dopamina na faixa de 10-200  $\mu\text{L}$  e fixando o volume de hemoglobina em 50  $\mu\text{L}$  com volume final variável de 1060 – 1250  $\mu\text{L}$ . Utilizando-se o instrumento CaryEclipse (Varian Inc, Palo Alto, CA, EUA) a intensidade de fluorescência foi medida com excitação de 279 nm e emissão de 315 nm para as soluções amostras.

## 4.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA INTERAÇÃO

### 4.5.1 Espectro-diferença por Absorção molecular

Para a determinação dos parâmetros de interação, ajuste não-linear conforme a equação 2 [34] será aplicada aos dados da curva de ligação produzidas no item 5.4.1.1, resultando na constante de dissociação ( $K_d$ ), possibilitando calcular a variação de energia de Gibbs pela equação 3.

$$y = \frac{B_{\text{máx}} x}{K_d + x} \quad (2)$$

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_a \quad (3)$$

Onde  $B_{\text{máx}}$  = Sítios

$R$  = Constante geral dos gases,  $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

$T$  = Temperatura absoluta, K (considerar  $25^\circ\text{C}$ , ou seja,  $298\text{K}$ )

$K_a$  = Constante de associação do complexo,  $\text{M}^{-1}$

$K_d$  = Constante de dissociação

$\Delta G^\circ$  = Variação de energia de Gibbs da ligação,  $\text{J mol}^{-1}$

### 4.5.2 Espectrofluorimetria

A determinação da constante de associação foi realizada pelo ajuste não linear dos dados (como no item anterior) obtidos da variação de fluorescência emitida (equação 4) por meio da construção do gráfico de  $\Delta F$  por concentração de DA.

$$\Delta F = F_0 - F \quad (4)$$

Onde  $F_0$  e  $F$  representam as intensidades de fluorescência da dopamina antes e após a adição de hemoglobina.

#### 4.6 ANÁLISE CONFORMACIONAL DA INTERAÇÃO DE HEMOGLOBINA COM DOPAMINA

##### 4.6.1 Sonda hidrofóbica 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS)

Visando obter informações sobre o estado conformacional do complexo Hb-DA (segmentos hidrofóbicos e/ou transições conformacionais), foram conduzidos ensaios utilizando-se a sonda fluorescente 8-anilino naftaleno sulfonato (ANS). Foi preparado uma solução estoque de ANS a  $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , a partir desta, foram preparadas duas novas soluções na proporção 1:1 de Hb-ANS e outra na proporção 1:10 de concentração, ambas com volume final de 10ml. Sobre o volume de 1mL do complexo Hb-ANS foi adicionado quantidades crescentes na faixa de 10 – 40  $\mu\text{L}$  de DA na concentração de  $0,0106 \text{ mol.L}^{-1}$ . O composto liga-se por adsorção a segmentos apolares em proteínas, especialmente aqueles próximos a vizinhança de cargas positivas [35]. O sinal fluorimétrico foi monitorado na faixa de 400 e 600 nm após excitação a 360 nm.

#### 4.7 ATIVIDADE PEROXIDÁSICA DO COMPLEXO HEMOGLOBINA-DOPAMINA

Uma solução estoque de guaiacol  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$  foi preparada. 1,5 mL de uma solução de Hemoglobina  $2,57 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  foi adicionado a 3 mL de Dopamina  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  e completado com tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4 para um volume final de 5mL de uma solução do complexo Hb-DA. Um solução contendo 100uL de guaiacol, 50uL de Hb-DA e 1mL de tampão acetato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 5 é preparada, sobre a qual é adicionado volumes crescentes de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )  $0,22 \text{ mol.L}^{-1}$  na faixa de 10-100 uL. Foram

realizadas leituras em 470 nm antes e após a adição do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no qual foi incubado por 8 minutos para que o produto tetraidroguaiacol fosse medido [36].

#### 4.8 VOLTAMETRIA CÍCLICA DA INTERAÇÃO.

Ensaio eletroquímico de voltametria cíclica foram realizados com soluções de dopamina, hemoglobina e do complexo, visando-se obter informações da interação baseadas na oxidação do catecol frente a proteína. Para isso foi utilizado um potenciostato PG-39 (Omni Metra Ltda, Nova Friburgo, RJ) conectado a PC, e uma célula eletroquímica composta de solução tampão a 5 mL, onde eram imersos os eletrodos, a saber: Ag/AgCl para referência, disco de ouro (2 mm de diâmetro) como auxiliar, e pasta de carbono como eletrodo de trabalho.

#### 4.9 POTENCIAL ZETA

Para obter-se mais informações acerca do potencial referente à carga superficial do complexo Hb-DA, foi empregado medidas do potencial Zeta como uma função de cargas superficiais em solução. O potencial Zeta mede a diferença entre o potencial de superfície de um coloide e sua suspensão líquida [37]. Assim, foram preparadas soluções de DA a  $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , Hb a  $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e Hb-DA em água bidestilada pH 7,4, volume final para 1 mL. As soluções foram caracterizadas por meio de medição do potencial Zeta e espalhamento dinâmica da luz (DLS) usando o dispositivo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) a  $25^\circ\text{C}$ .

#### 4.10 ANÁLISE DE DADOS.

Os ensaios foram conduzidos a um mínimo de triplicata e os dados apresentados com média e erro padrão da média. Os ensaios que não foram conduzidos em triplicatas, serão informados na legenda com n° (número de replicatas). A análise estatística bem como ajustes lineares e não lineares foi conduzida com auxílio do software de análise e gráficos OriginPro 8.5 (Origin Lab Co, Northampton, MA, EUA [38]).

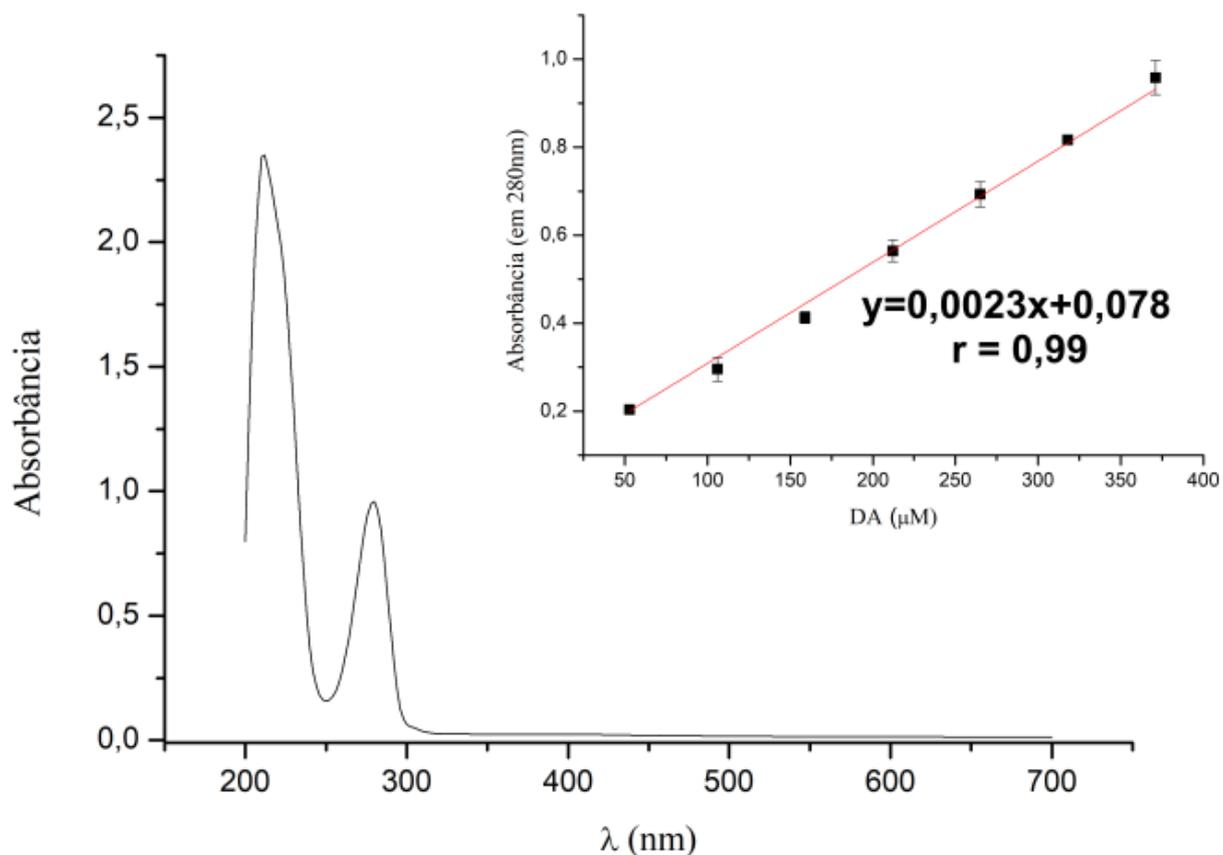
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA

#### 5.1.1 Dopamina

A figura 7 mostra o espectrograma da DA que apresenta dois picos em 220 e 280 nm, sendo estas regiões de absorbância característica de compostos aromáticos [39]. A curva analítica (inserto da figura 7) obtida pelos valores de absorbância em 280 nm demonstrou uma forte correlação linear, com um coeficiente de Person de 0,99.

Figura 7 - Espectrofotograma de absorção molecular da DA a  $371 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4  $25^\circ\text{C}$ . Inseto: Curva analítica da dopamina obtida em 280 nm na faixa de 53 a  $371 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

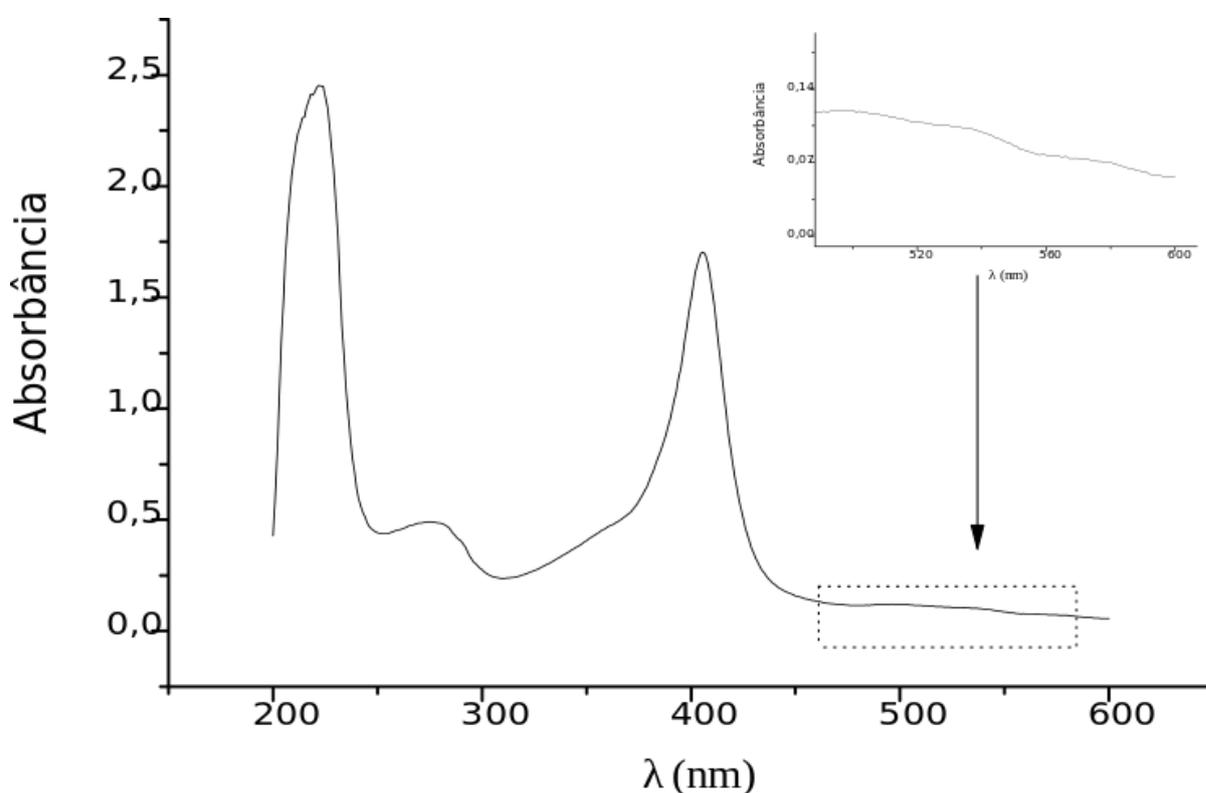


Fonte: Autoral

### 5.1.2 Hemoglobina

O espectro de absorção da Hb foi registrado entre as regiões de comprimento de onda de 200 e 600 nm, e apresentou dois picos de absorção, em 215 e 405 nm (figura. 8). O primeiro pico é principalmente devido às transições  $\pi - \pi^*$  dos grupos carbonila (C = O) dos resíduos de aminoácidos, o outro, refere-se a banda porfirina-Soret também de transição do tipo  $\pi - \pi^*$  [40, 41]. A banda Soret origina-se do espectro do grupo *heme* incorporado em uma bolsa hidrofóbica formada pelo esqueleto da proteína através de dobramento apropriado [40]. As regiões que compreendem picos entre 540 nm e 580 nm, respectivamente dizem respeito ao estado de oxiemoglobina e desoxiemoglobina. No primeiro estado é possível observar a formação de dois picos e no segundo estado ambos os picos se achatam resultando em apenas um pico amplo [42]. Entretanto, tais características não foram observadas em nossos ensaios (inserto da figura 8).

Figura 8 - Espectrofotograma de absorção molecular de Hb a  $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4  $25^\circ\text{C}$ . Inseto: Ampliação da região que compreende de 540 a 580 nm para evidenciar a distinção entre os estados oxi e deoxi do pigmento respiratório.



Fonte: Autoral

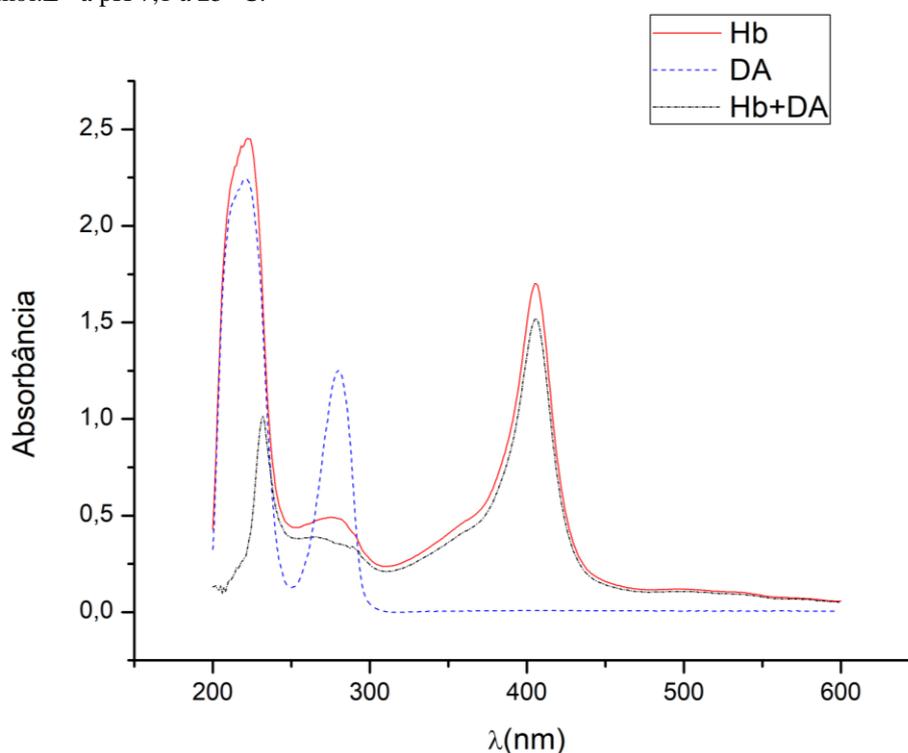
## 5.2 INTERAÇÃO HEMOGLOBINA-DOPAMINA

A Hb já é conhecida por ligar-se reversivelmente a várias moléculas endógenas como o 2,3-bisfosfoglicerato [43], glicose [44] e ácido úrico [45], bem como a moléculas exógenas tais como Alprazolam [40], Hesperetina [46], Rodamina 6G [47] e Paraquat [48]. Com base no espectrograma da figura 9, é possível observar uma queda da absorbância da Hb quando em contato com a dopamina em solução.

Em 215 nm, região correspondente ao esqueleto carbônico da proteína [47] esta queda da absorbância foi mais brusca em relação à banda em torno de 280 nm, relativo a resíduos de aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr e Phe) [42, 43], um deslocamento batocômico também pode ser observado na figura 9, de 215nm para 232 nm, sugerindo uma alteração de polaridade do ambiente em torno do ligante.

Em 415 nm, região que corresponde à banda de Soret do grupo *heme* da proteína, não foi observado deslocamento do pico, apenas sua redução. Desta forma, esses resultados indicam que houve formação do complexo Hb-DA [41, 47, 49, 50].

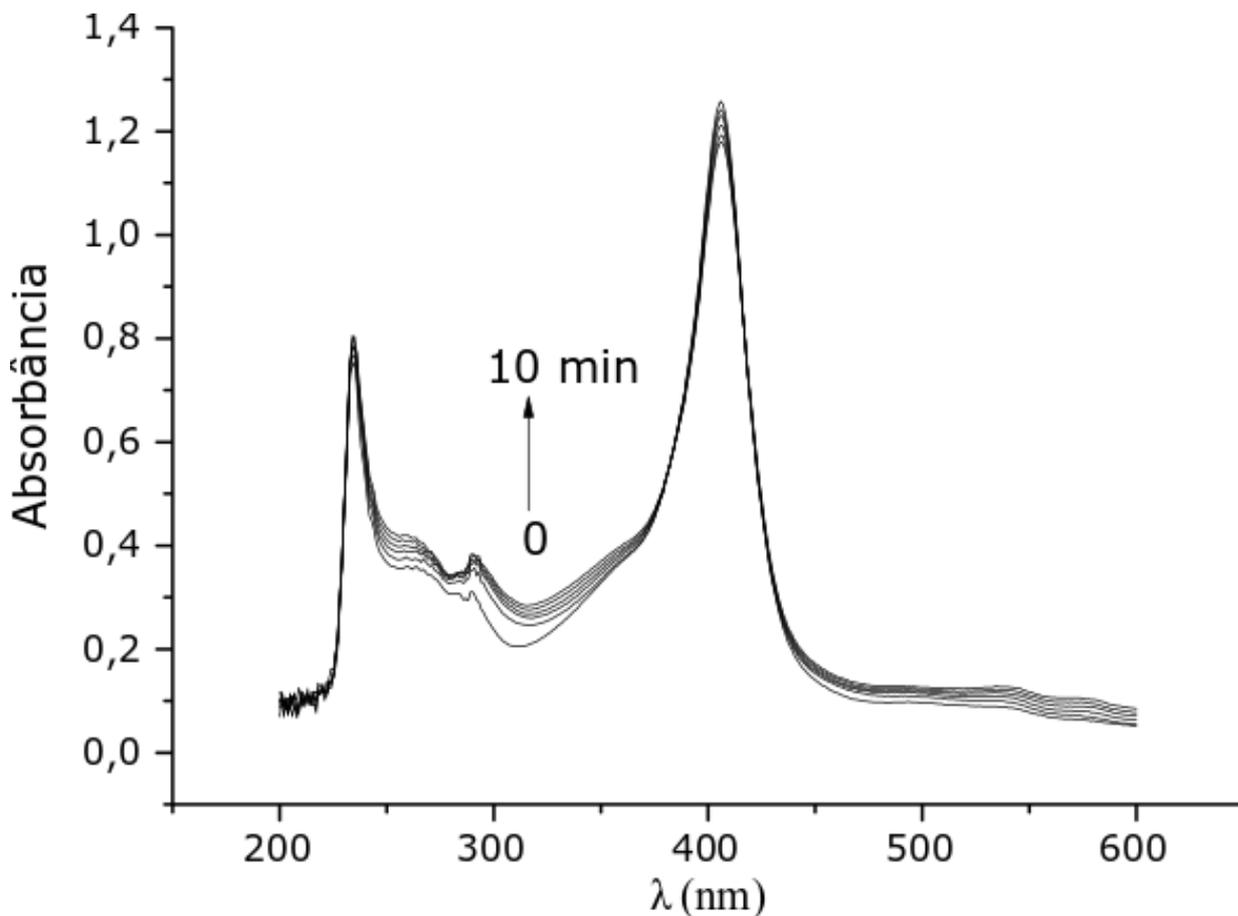
Figura 9 - Espectrofotograma de absorção molecular de Hb a  $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , DA a  $159 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e de ambos (Hb-DA) respectivamente nas mesmas proporções anteriores em solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  a pH 7,1 a  $25^\circ\text{C}$ .



Fonte: Autoral

A interação da associação foi monitorada em diferentes períodos e faixa termal de 15 a 43° C. Apenas em 43° C a intensidade do espectro de absorção da mistura teve aumento em até 10 min, estabilizando-se em seguida, como pode ser observado na figura 10. Não houve variação perceptível dos espectros entre 15 e 39° C [51].

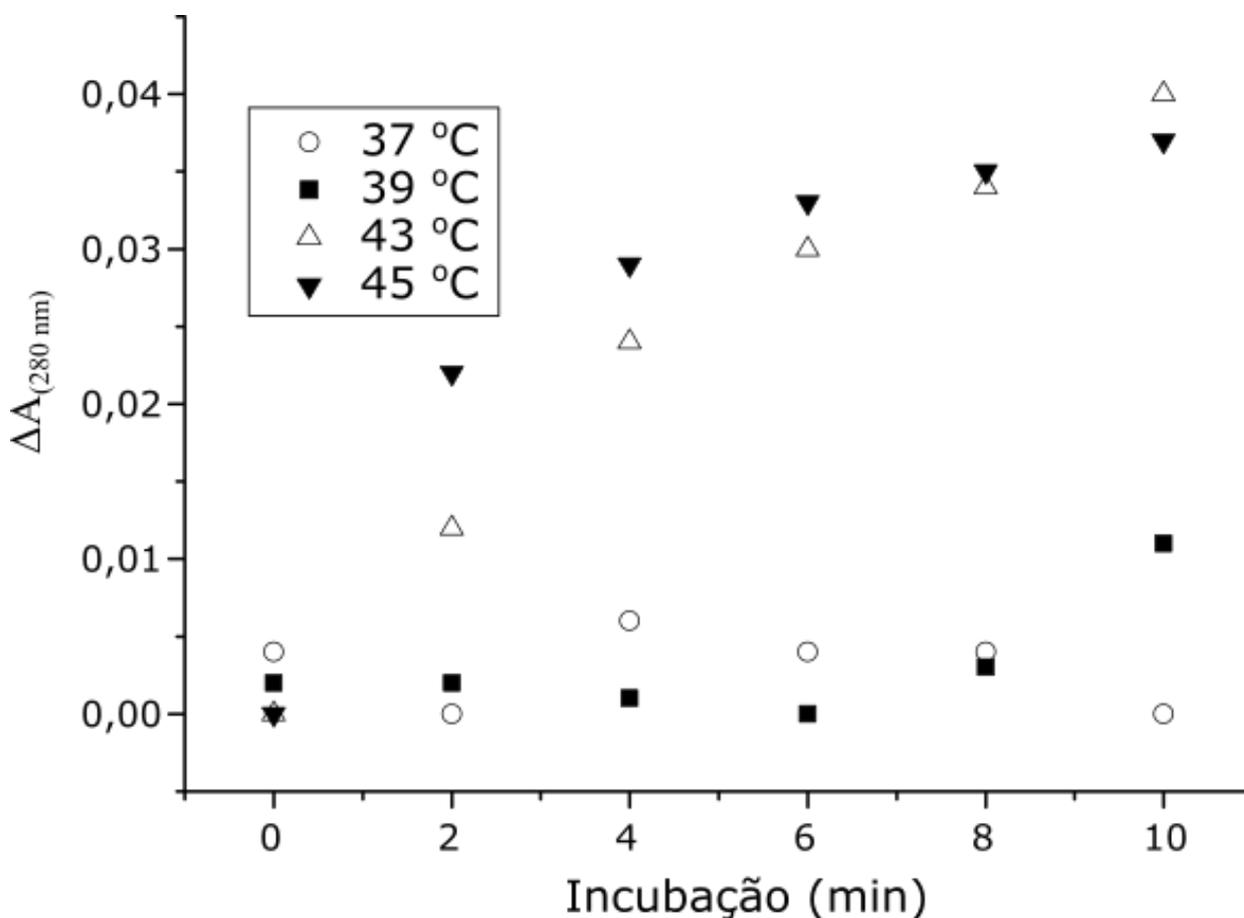
Figura 10 - Espectrofotograma de absorção molecular de Hb a  $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$  com DA a  $159 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  a pH 7,4 a 43°C ao longo de 10 min.



Fonte: Autoral

A figura 11 apresenta a variação do sinal em comprimento de onda de absorção em 280 nm, na faixa térmica de 37 a 45° C. Pode-se observar que em temperaturas mais elevadas (43-45°C) parece ter ocorrido maior exposição de resíduos aromáticos na proteína, sugerindo uma pequena transição conformacional nesta [52], frente aos valores de espectro-diferença obtidos.

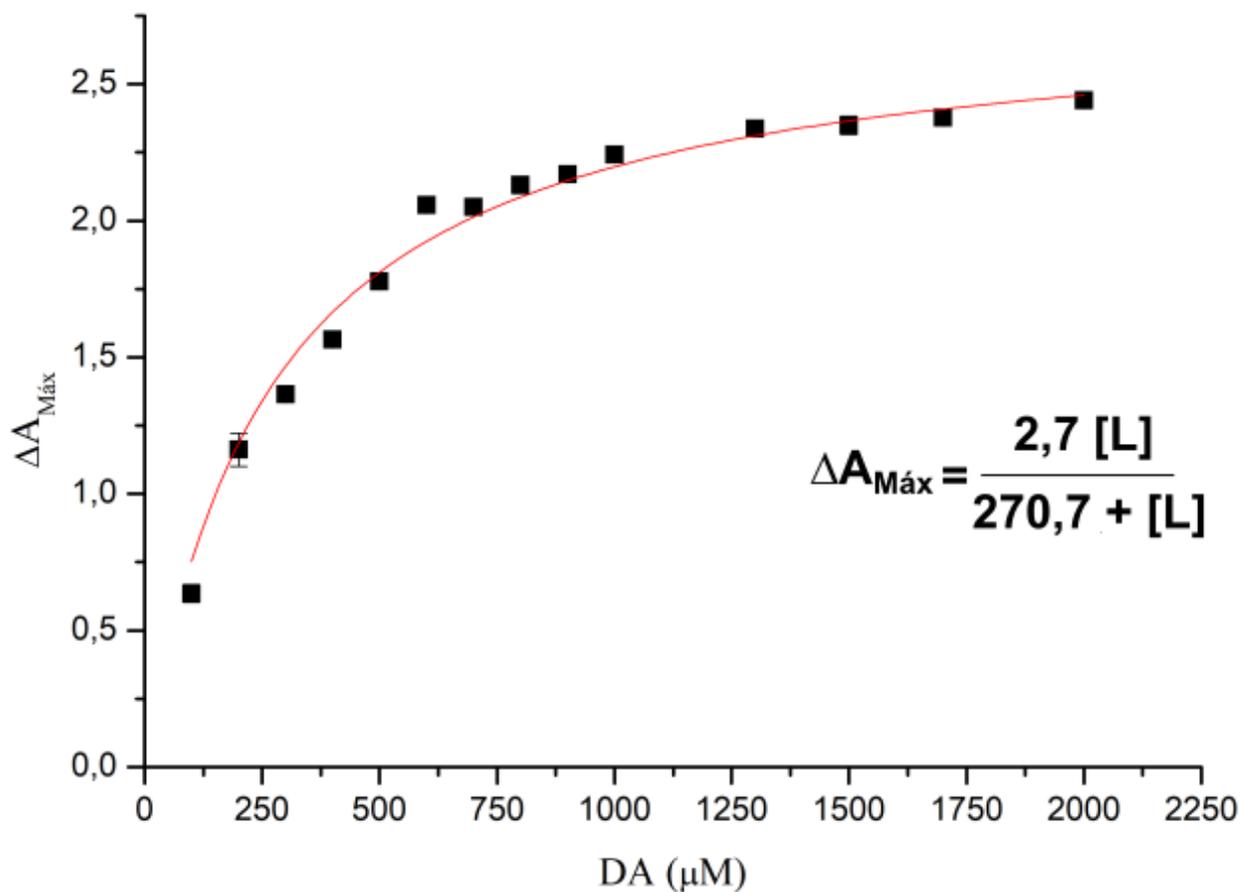
Figura 11 - Influência da temperatura na formação do complexo Hb-DA (Hb a  $3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  e DA a  $159 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,1 ao longo de 10 min nas temperaturas de 37, 39, 43, 45 °C,  $n^\circ = 1$ .



Fonte: Autoral

Com base na isoterma de ligação representada na figura 12 obtida a partir de diferentes concentrações de dopamina sobre um teor fixo de hemoglobina à 37 °C, os picos de espectro-diferença obtidos dos pontos máximos de absorção indicam que houve uma tendência de saturação do ligante sobre a proteína. Um ajuste não linear da equação 2 aos dados resultou em valor de constante de dissociação,  $K_d$  de  $270,7 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 24,3$ .

Figura 12 - Curva de saturação de DA sobre Hb a  $3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  para determinação de  $K_d$  por ajuste não linear por meio da equação 2 dos dados de absorção obtidos a  $25^\circ\text{C}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4.



Fonte: Autoral

Esses dados também nos auxiliam a compreender possíveis modos de ligação para a formação do complexo, em função da distribuição do sinal de diferença e concentração de dopamina (figura 13). Na ausência de informação a respeito da estequiometria da interação, a constante de dissociação aparente também pode ser determinada a partir de um tratamento de linearização proposto por Benesi-Hildebrand [53] (figura 13-A), conforme a relação que segue:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{K_{\text{BH}}(\Delta A_{\text{max}}) [\text{L}]} + \frac{1}{\Delta A_{\text{max}}} \quad (5)$$

onde  $\Delta A$  representa a variação de absorvância,  $\Delta A_{\max}$  é a variação máxima de absorvância, e  $K_{BH}$  é a constante de ligação Benesi-Hildebrand e  $[L]$  é a concentração do ligante livre.

O tratamento de Benesi-Hildebrand [54], assume que a diminuição na absorção ( $\lambda_{\max}$ ) é inteiramente devido à formação de um complexo 1:1 para um conjunto homogêneo de sítios de ligação na macromolécula; por outro lado um afastamento da linearidade indica que o complexo formado não tem a estequiometria 1:1 esperada. Pelo tratamento acima foi calculado por ajuste linear ponderado um  $K_{HB}$  para a interação Hb-DA de  $2,7 \times 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ , representando um  $K_d$  de  $373,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Por outro lado, o tratamento proposto por Scatchard (equação 6) [55, 56] auxilia, além da descrição quantitativa da interação proteína-ligante, no diagnóstico do mecanismo de interação propriamente dito, podendo identificar situações de cooperatividade ou heterogeneidade de sítios de ligação, bem como transições conformacionais no biopolímero.

$$\frac{\Delta A}{[L]} = \frac{\Delta A_{\max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} \Delta A \quad (6)$$

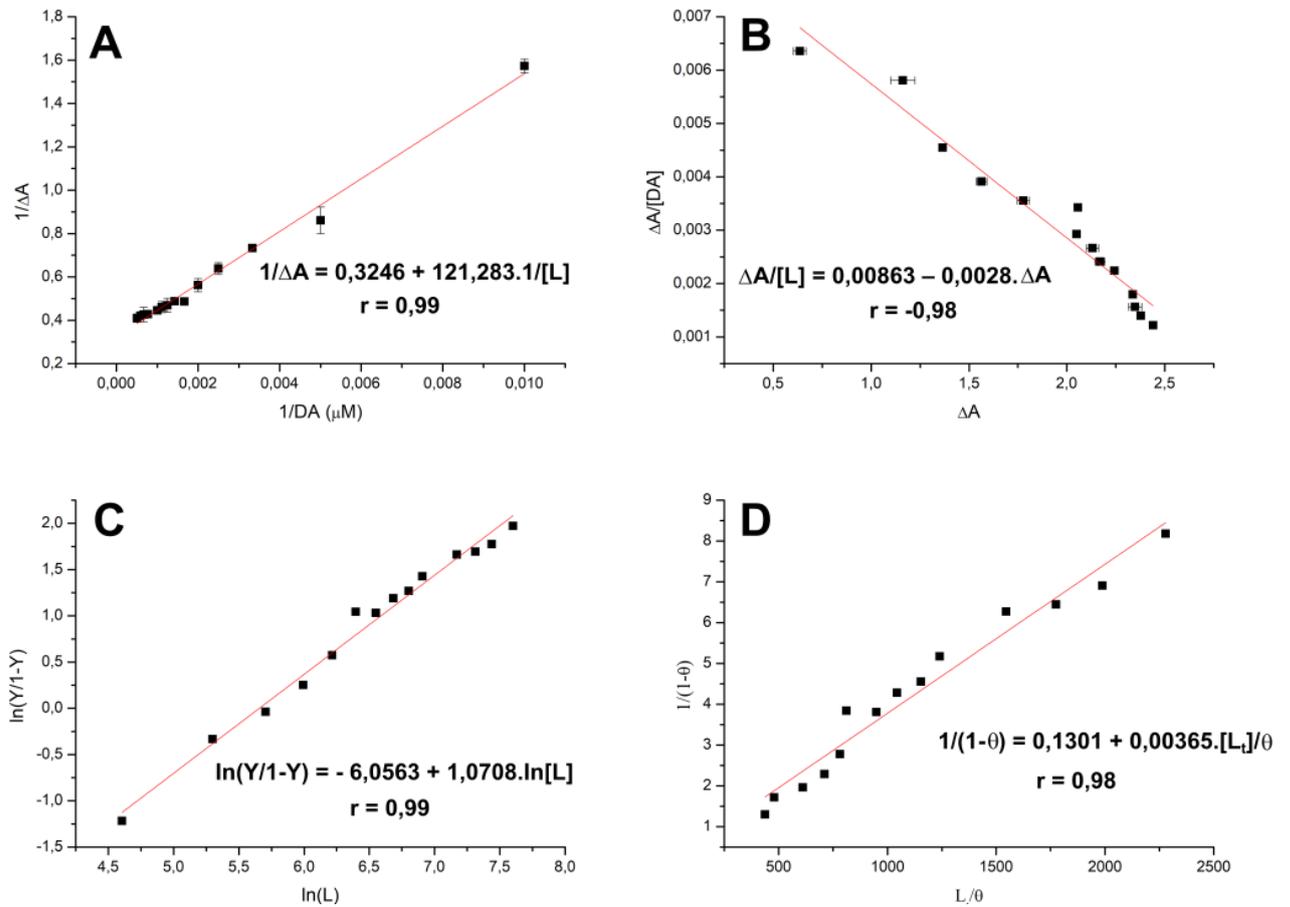
Onde  $\Delta A$  representa a variação de absorvância,  $\Delta A_{\max}$  é a variação máxima de absorvância,  $K_d$  é a constante de dissociação e  $[L]$  é a concentração do ligante livre.

O perfil linear do gráfico de Scatchard (fig. 13-B) corrobora com os de Benesi-Hildebrand na formação de um complexo 1:1, descartando a ideia de um comportamento homocooperativo para a interação Hb-DA característica da proteína com o oxigênio molecular ( $O_2$ ). Outra linearização de dados também permite identificar fenômenos cooperativos para a interação, tais como o de Hill. Por esse tratamento a inclinação da representação de Hill (fig. 13-C) obtida por meio da equação 7 [55] reforça um modelo não cooperativo para o complexo Hb-DA, uma vez que foi obtido um valor de 1,07 para o coeficiente de Hill.

$$\ln \frac{Y}{(1-Y)} = n_H \ln[L] - \ln K_d \quad (7)$$

Onde Y é a razão do sinal de espectro-diferença  $\Delta A/\Delta A_{max}$  e  $n_H$  é o coeficiente de Hill.

Figura 13 - Representação de Benesi-Hildebrand (A), Scatchard (B), Hill (C) e Maitra (D) para os dados de interação Hb-DA obtidos a partir da curva de saturação a 37°C em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,4.



Fonte: Autoral

O número total de sítios disponíveis para a interação de dopamina à hemoglobina pode ser determinado pela relação de Maitra abaixo [40], representada na figura 13-D

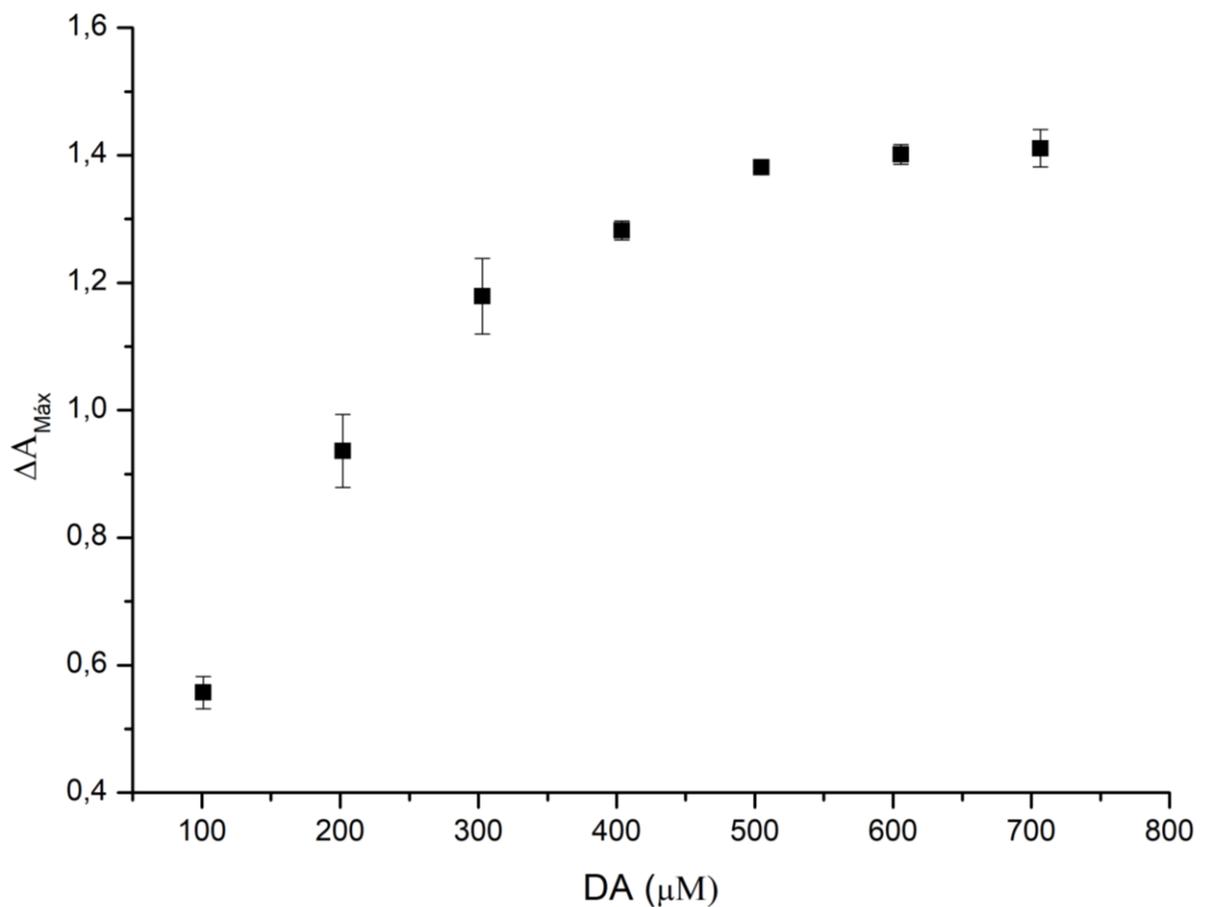
$$\frac{1}{1-\theta} = n \frac{[L]}{\theta} - Kbp \quad (8)$$

Onde  $\theta$  é a razão do sinal de espectro-diferença  $\Delta A/\Delta A_{max}$ , K é a constante de equilíbrio de formação do complexo, b é o número total de sítios disponíveis para interação e p é a concentração da proteína.

Pela equação 8 o número de sítios de ligação de dopamina por molécula de hemoglobina foi de 9,6. Dada a identidade tetramérica de polímeros similares da estrutura quaternária da Hb, isso sugere que a interação Hb-DA ocorreu com 2 moléculas de DA para cada monômero de Hb.

A fim de avaliar se a interação da DA com Hb ocorre em sua interface, um ensaio nas mesmas condições foi realizado com mioglobina, uma proteína monomérica que se assemelha estruturalmente com a Hb. Com base nos resultados apresentados na figura 14 é possível inferir que ocorre ligação da DA com a mioglobina, refutando as suspeitas.

Figura 14 - Curva de saturação de DA sobre Mioglobina a  $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$  obtidos a  $25^\circ\text{C}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4.

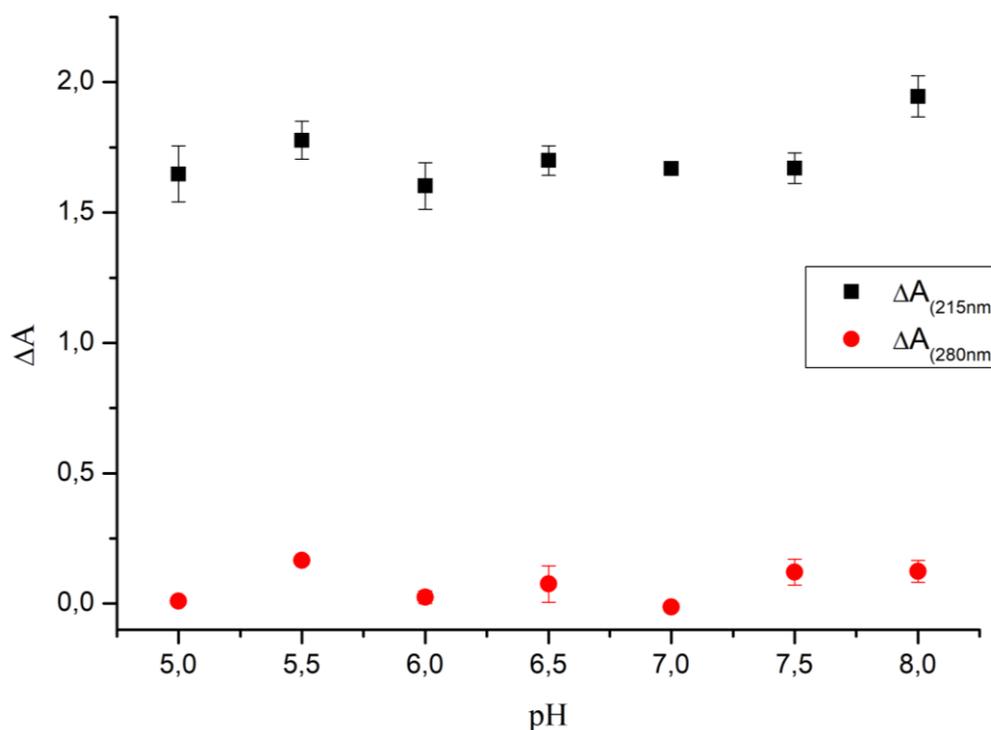


Fonte: Autoral

### 5.2.1 Efeito de pH para a formação do complexo Hb-DA

A fim de se avaliar a contribuição eletrostática do ligante, (pKa(s) de pKa1 = 8.71; pKa2 = 10.90; pKa3 = 13.68 [57]) e da hemoglobina (pI = 6,95 [58]) para a interação, foram realizados ensaios com variação de pH. Como é possível observar na figura 15, não foi observado mudanças significativas na intensidade de absorvância em 280 e 215 nm que correspondem às regiões que evidenciaram a formação do complexo, sugerindo que as interações eletrostáticas têm pouca contribuição para o complexo formado [39], isto com base no teste t-Student de significância estatística conduzido para os valores de variação de absorvância. Os resultados mostraram que não houve variação de absorvância dependente de pH, uma vez que foi obtido um  $t_{\text{observável}}$  para 215nm de 0,219 e 0,303 para 280nm, valores bem baixos em relação ao  $t_{\text{teórico}} = 2,09$ .

Figura 15 - Espectro-diferença da formação do complexo Hb a  $3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  e DA a  $159 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pH de 5 a 9 avaliados pelos picos em 215 e 280 nm.



Fonte: Autoral

### 5.2.2 Potencial Zeta

Com o intuito de confirmar a presença de DA na superfície da Hb, análise por potencial zeta foi realizado. O potencial zeta é um indicador de cargas superficiais acessíveis e foi determinado para Hb e DA em concentrações fixas. A partir da tabela I, deduz-se que a Hb foi capaz de compensar as cargas negativas da DA, isto com base na redução do potencial zeta de  $12,3 \pm 0,6$  para  $6,7 \pm 0,04$  mV, indicando alterações nas propriedades da superfície após a exposição à DA [59, 60, 61]. Esta observação também é suportada pelos dados de espalhamento dinâmico de luz (DLS), em que foi observado um aumento do diâmetro relativo para o complexo Hb-DA em relação a Hb [60, 62].

**Tabela 1** - Média dos resultados obtidos por potencial zeta em solução aquosa pH 7,4 a 25°C.

	Condutividade (mS/cm)	Potencial Zeta (mV)	DLS (d.nm)
DA	$0,142 \pm 0,06$	$- 4,7 \pm 0,8$	$1195 \pm 1060$
Hb	$0,05 \pm 9,5 \times 10^{-4}$	$12,3 \pm 0,6$	$340,4 \pm 63,4$
Hb-DA	$0,08 \pm 3 \times 10^{-3}$	$6,7 \pm 0,04$	$1645 \pm 76,2$

Fonte: Autoral

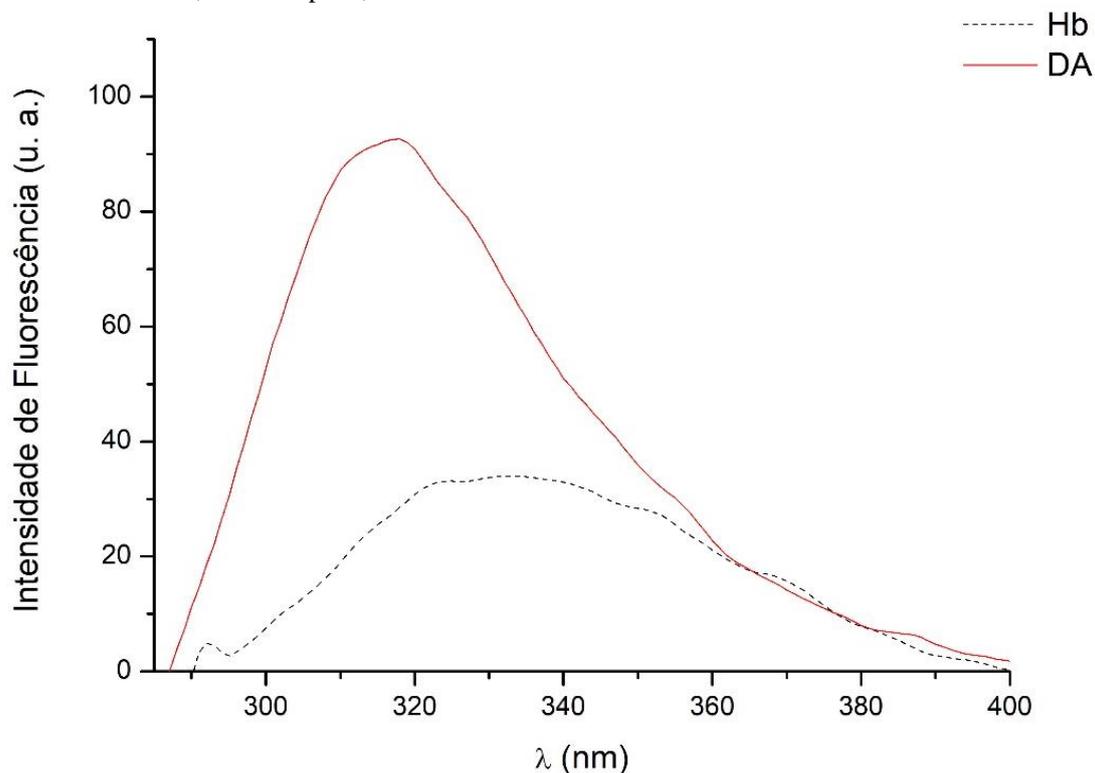
### 5.3 CARACTERIZAÇÃO FLUORIMÉTRICA

#### 5.3.1 Hemoglobina e Dopamina.

A Hb possui 141 resíduos de aminoácidos na cadeia  $\alpha$  e na cadeia  $\beta$  146. Existem três fluoróforos principais: triptofano, tirosina e fenilalanina. A hemoglobina tetramérica contém seis resíduos de triptofano: dois Trp $\alpha$ 14, dois Trp $\beta$ 15 e Trp $\beta$ 37 [63]. Entre os três resíduos de Trp, apenas o Trp $\beta$ 37 está situado na interface dímero-dímero, e tem sido associado como responsável pela resposta emissiva de fluorescência [63]. Esta é a região onde as diferenças estruturais e, as sensibilidades à mudança de estrutura quaternária são maiores [47, 48].

A dopamina possui um  $\lambda_{ex}$  de 279 nm [64], enquanto a hemoglobina um  $\lambda_{ex}$  de 280 nm [46], com ambas espécies emitindo fluorescência na mesma faixa entre 285 a 400 nm como pode ser observado na figura 16.

Figura 16 - Emissão de fluorescência da Hb 7,04  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e DA a 481,8  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $\lambda_{ex} = 280$  nm) em tampão fosfato 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$  pH 7,4 a 25°C.



Fonte: Autoral

### 5.3.2 Interação Hemoglobina-Dopamina

A formação do complexo medida por emissão de fluorescência foi conduzida fixando-se tanto o ligante bem como a proteína, visando-se observar a contribuição individual de cada sinal de diferença para a formação do complexo.

#### 5.3.2.1 Titulação de Hemoglobina sobre Dopamina

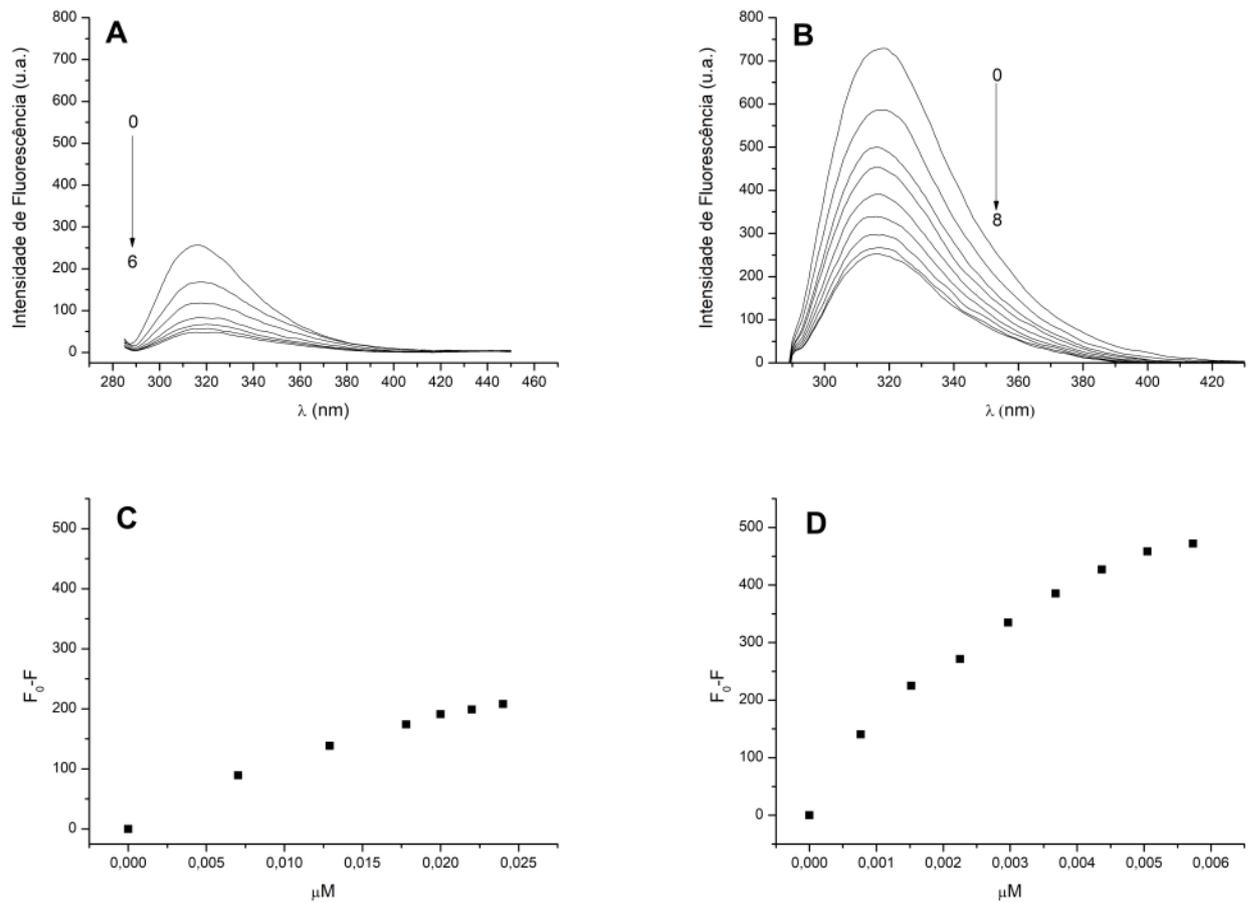
Com base nos resultados representados da figura 17, é possível observar que tanto em 17-A como em 17-B, o sinal da dopamina é reduzido frente a subsequentes adições crescentes de concentrações de Hb. Independentemente do modo de titulação, tanto em tubo de ensaio ou seriada, os resultados parecem convergir a uma saturação, como representado nas figuras 17-C e 17-D. Contudo tendo em vista que a DA se apresenta como um fluoróforo de alta emissividade com excitação em 279 nm [64] e que o complexo Hb-DA parece não emitir sinal de fluorescência na faixa de onda dos ensaios, o decréscimo da fluorescência de DA na presença de Hb proporcionou um ensaio mais sensível para a proteína [65], bem como para a caracterização da formação do complexo [47, 66].

#### 5.3.2.2 Titulação de Dopamina sobre Hemoglobina.

Ensaio prévios mostraram que a contribuição do sinal emissivo da DA é significativamente maior que da Hb, embora ambos ocorram em bandas similares (285-400 nm). A Figura 18 apresenta a isoterma de ligação obtida por fluorimetria em 25 °C para os complexos Hb-DA, bem como o ajuste não linear dos dados a uma função hiperbólica (equação 2), permitindo-se a determinação de  $K_d$ . O valor encontrado para o complexo foi de  $K_d = 292,2 \pm 1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , cerca de duas vezes menor que o encontrado

para a interação de  $O_2$  à hemoglobina [67]. Isso sugere uma possível influência de dopamina sobre as funções biológicas do pigmento respiratório.

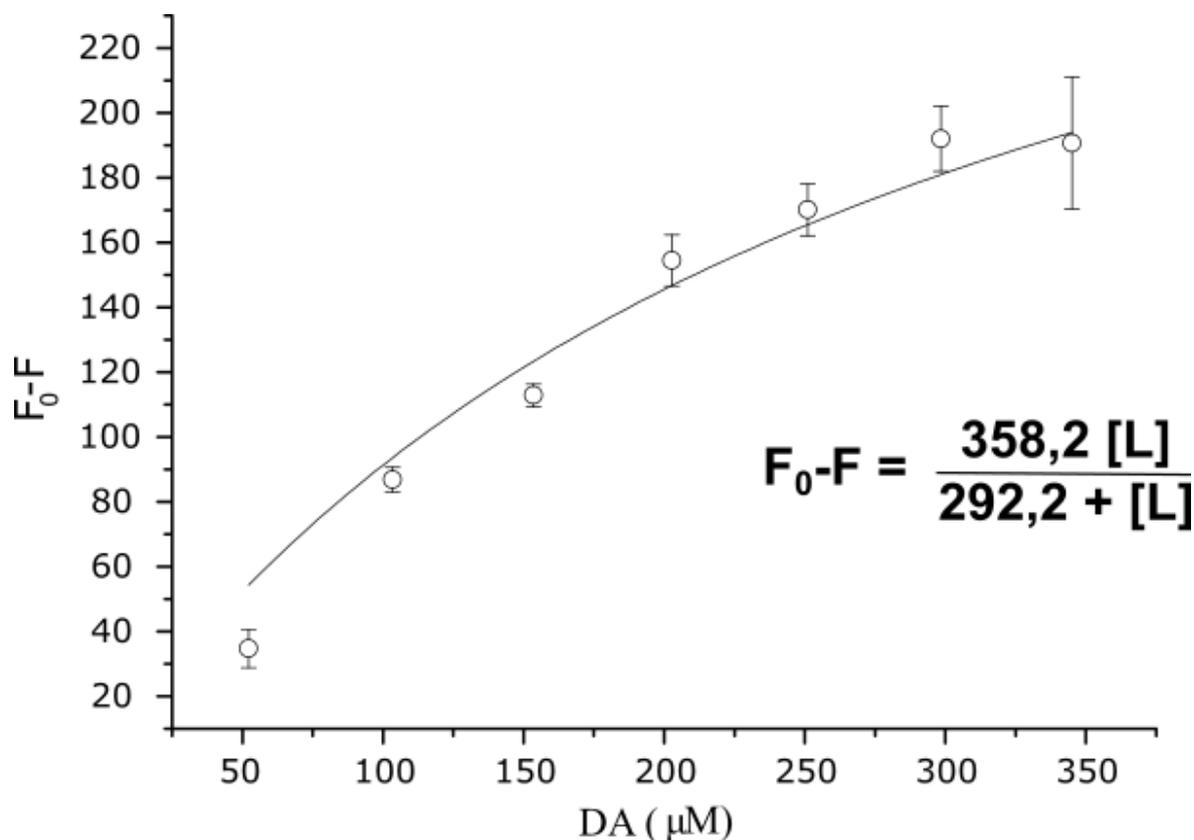
Figura 17 - Emissão de fluorescência da DA em diferentes concentrações de Hb.



Fonte: Autoral

Legenda: A-C) Titulação em tubos de ensaio separados da DA com concentrações crescentes de Hb, 0-6: de 0 a 24  $\mu mol.L^{-1}$ . B-D) Titulação seriada da DA com concentrações crescentes de Hb, 0-8: de 0 a 5,7  $\mu mol.L^{-1}$ . C) e D) picos de fluorescência em 315 nm, onde  $F_0$  representa DA livre e F ligada a Hb, ( $\lambda_{ex} = 280$  nm)  $n^\circ = 1$ .

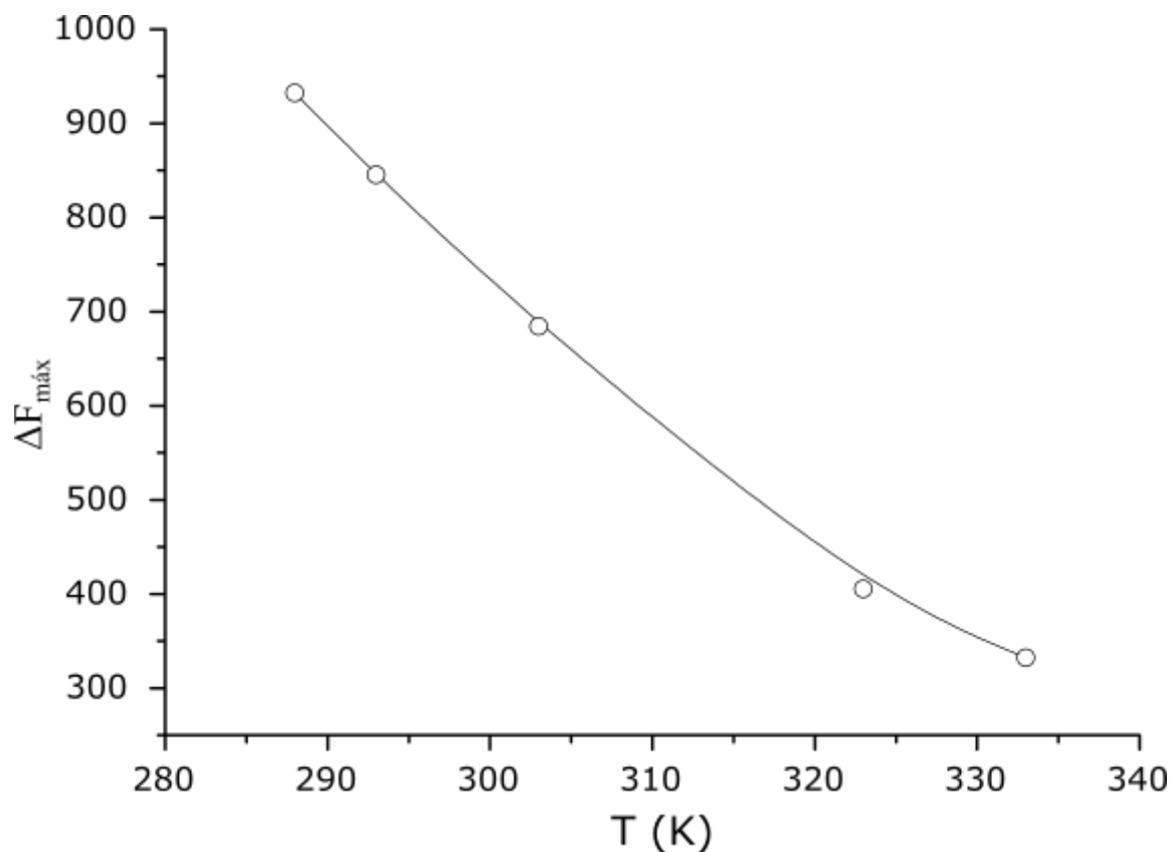
Figura 18 - Curva de saturação de Hb sobre DA para determinação de  $K_d$  por ajuste não-linear por meio da equação 2 dos dados de fluorescência obtidos a 25°C em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,4.



Fonte: Autoral

A extinção de fluorescência pode resultar de uma variedade de processos, como reações de estados excitados, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexos no estado fundamental ou interações colisionais. Existem dois mecanismos principais de extinção da fluorescência: extinção dinâmica e estática [49]. Os dois mecanismos de extinção podem ser identificados pela tendência diferente da flutuação da vida útil no estado excitado com o aumento da temperatura [68]. A figura 19 mostra que houve uma relação entre a diminuição da fluorescência com o aumento da temperatura, sugerindo que a extinção da fluorescência tenha sido estática e reforçando a formação do complexo Hb-DA.

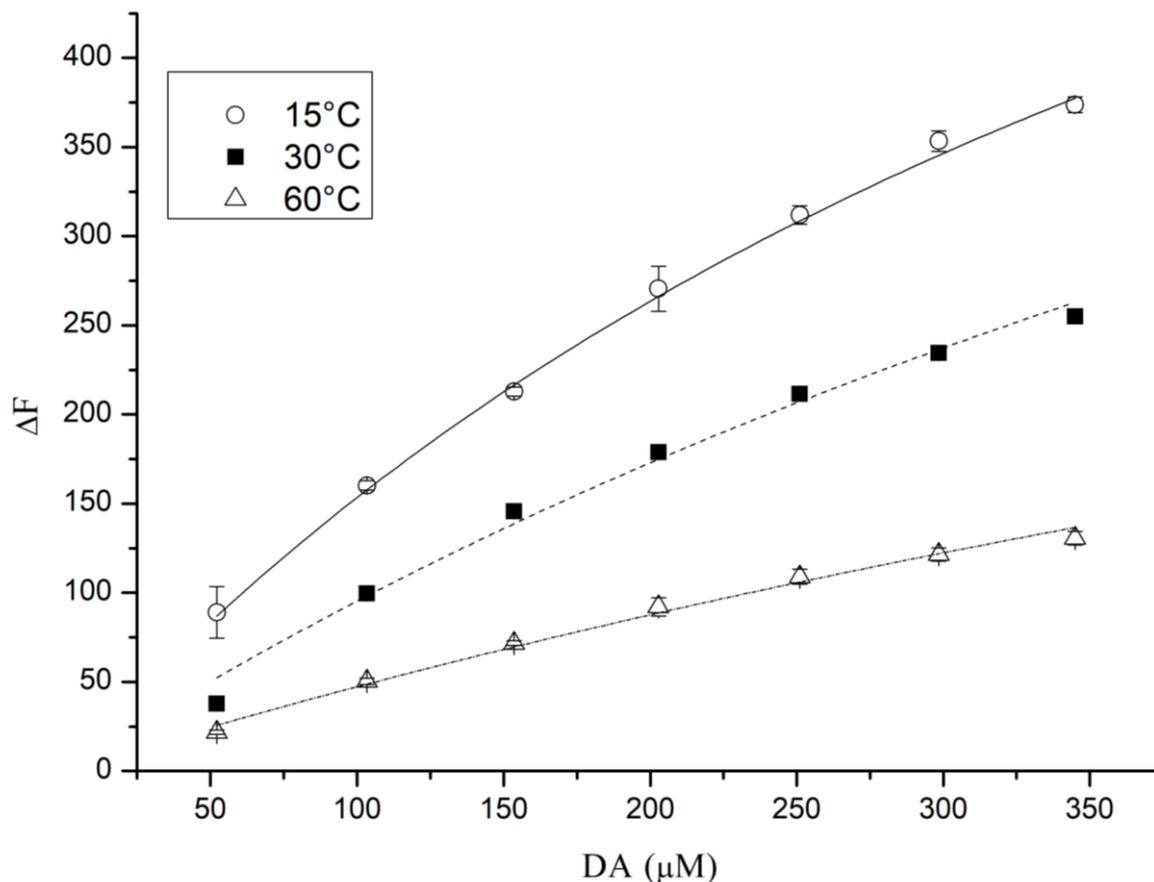
Figura 19 - Variação de fluorescência máxima do complexo ( $F_0-F$ ) em função da temperatura: 288, 293, 303, 323, 333 K em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,4, n° = 1.



Fonte: Autoral

Na extinção estática, a estabilidade do composto formado diminui com o aumento da temperatura [69]. Já na extinção dinâmica, a elevação da temperatura tende a aumentar o número de colisões efetivas, elevando a transferência de energia e o sinal de fluorescência. Os resultados da figura 20 também reforçam que a extinção de fluorescência entre Hb e DA foi estática, uma vez que, com o aumento da temperatura a formação do complexo foi desfavorecida.

Figura 20 - Isotermas de interação de DA: de 50 a 350  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , com Hb 7,04  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  em distintas temperaturas: 288, 303 e 333 K.



Fonte: Autoral

### 5.3.3 Parâmetros termodinâmicos da formação do complexo.

Existem essencialmente quatro tipos de interações não covalentes que podem desempenhar um papel na interação do ligando a proteínas. Estas são ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas e efeito ou interações hidrofóbicas [48]. Para obter tais informações os parâmetros termodinâmicos podem ser determinados diretamente por microcalorimetria (titulação isotérmica, por ex, [70]) ou indiretamente, como realizado neste trabalho, a partir da equação de Van't Hoff [48, 69, 71]:

$$\ln K_d = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (9)$$

Onde  $K_d$  é a constante de ligação na temperatura correspondente, e  $R$  é a constante universal dos gases. A mudança de entalpia ( $\Delta H$ ) e a mudança de entropia ( $\Delta S$ ) é calculada a partir da inclinação e ordenada do gráfico de Van't Hoff. A mudança de energia livre ( $\Delta G^\circ$ ) é estimado a partir da seguinte relação:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (10)$$

Os parâmetros termodinâmicos da reação de ligação são a principal evidência para confirmar o modo de ligação. De acordo com Ross e Subramanian [72], se a mudança de entalpia  $\Delta H = 0$  e entropia  $\Delta S > 0$ , a força principal é o efeito eletrostático; se  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ , a interação hidrofóbica desempenha um papel importante na reação; se  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ , as forças principais são as interações de van der Waals e de ligação de hidrogênio e se  $\Delta H$  e  $\Delta S$  apresentarem-se muito baixo, positivo ou negativo, as interações iônicas predominam [40].

Com base nos resultados apresentados na tabela 2 obtidos pela linearização do gráfico da figura 21, o efeito hidrofóbico parece desempenhar papel preponderante para a formação do complexo Hb-DA, sugerindo a exclusão de moléculas do solvente nos sítios de interação do ligante, bem como menor especificidade de grupos polares envolvidos na macromolécula. O valor de  $\Delta H$  pode ser significativo, sendo o efeito eletrostático complementar em função da amina da DA. A formação do complexo revelou-se também espontânea, com um  $\Delta G^\circ$  de  $-15,7 \text{ kJ mol}^{-1}$  em  $25^\circ\text{C}$ .

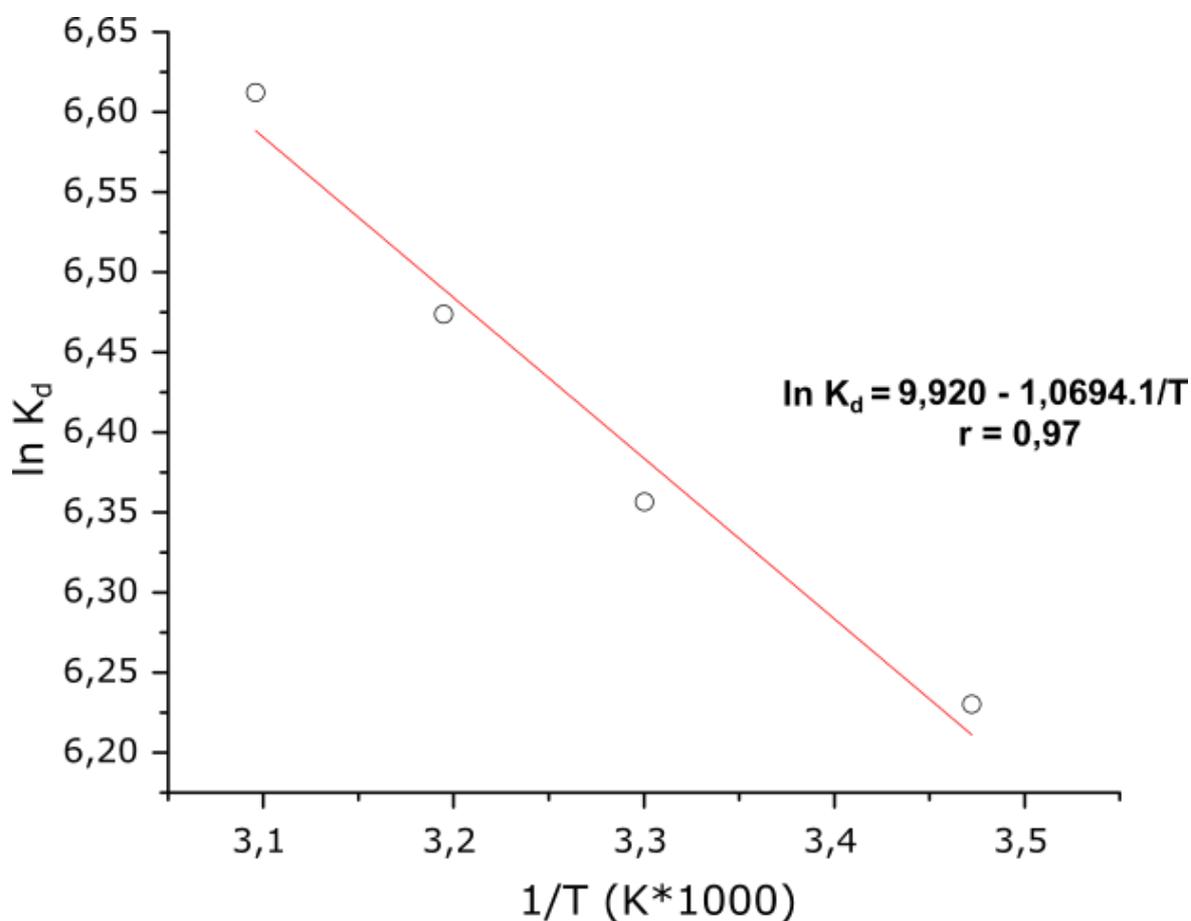
Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos da interação Hb-DA em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,4 a  $25^\circ\text{C}$ .

$\Delta S^\circ \text{ (J mol}^{-1}\text{K}^{-1}\text{)}$	$\Delta H^\circ \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$	$T\Delta S^\circ \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta G^\circ \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$ *
+82,2	+8,8	+24,5	-15,7

\* Temperatura = 298K

Fonte: Autoral

Figura 21 - Representação de Van't Hoff para a formação do complexo.



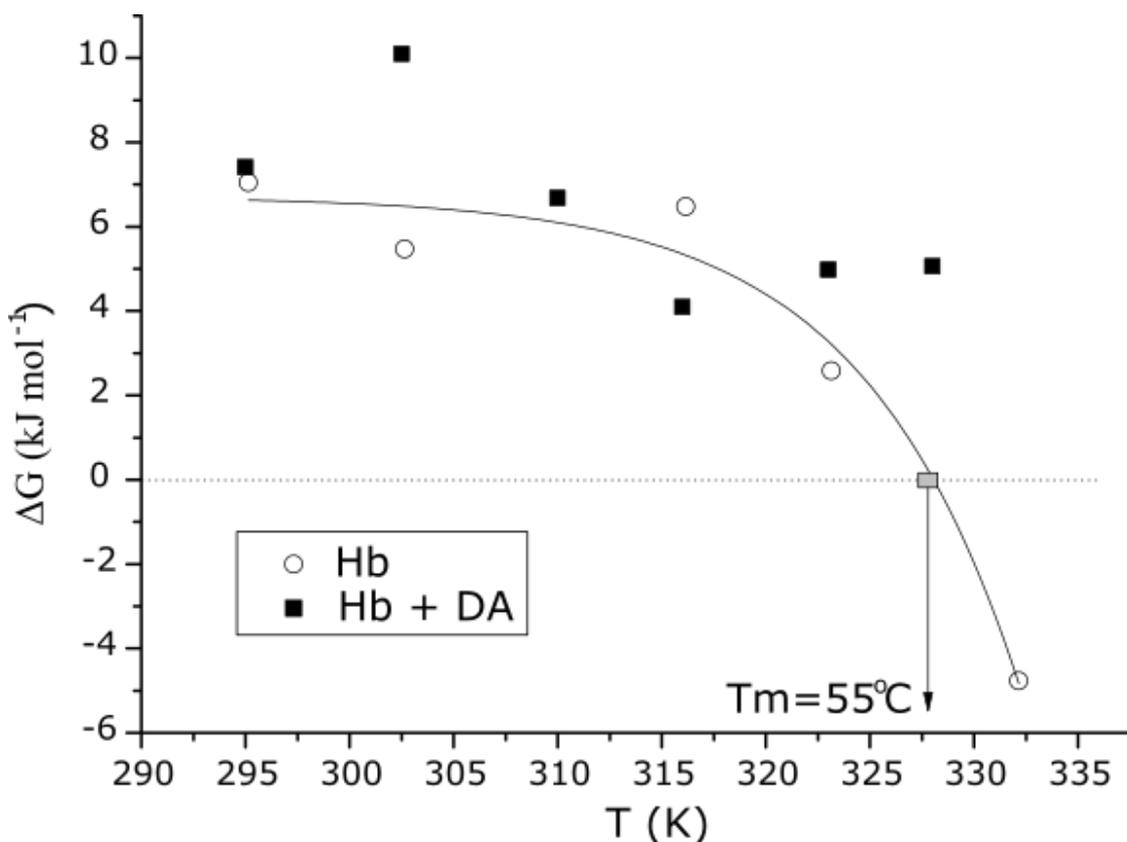
Fonte: Autoral

### 5.3.4 Estabilidade da Hemoglobina complexada a Dopamina

A fim de se avaliar a possibilidade da dopamina estabilizar ou não a proteína na formação do complexo, medidas de  $\Delta G$  obtidas em diferentes temperaturas foram contrastadas com a proteína pura e na presença do ligante. Como pode ser observado na figura 22 para a hemoglobina livre, um  $T_m$  de 55°C foi calculado, não muito distante do relatado na literatura (60°C) [51], entretanto a termoestabilidade do complexo pouco diferiu da referida proteína isoladamente. Contudo, embora tenha-se obtido maiores valores para  $\Delta G$  ao complexo em temperaturas superiores a 50 °C, o que poderia sugerir um possível ganho de estabilidade termodinâmica do biopolímero com a formação do

complexo, não foi possível a obtenção do sinal para o complexo na temperatura mais alta devido à precipitação do sistema, evidenciada por inspeção visual da cubeta conte do as soluções. Nesse sentido, sugere-se que a dopamina parece desestabilizar a macromolécula, embora essa hipótese requeira a obtenção de novos dados experimentais, tais como sua atividade biológica.

Figura 22 - Estabilidade termodinâmica de Hb a  $7,04 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e do complexo em função da temperatura,  $n^\circ = 1$ .



Fonte: Autoral

### 5.3.5 Análise conformacional da interação de Hemoglobina-Dopamina

Com o intuito de avaliar a hipótese de contribuições hidrofóbicas preponderante ao complexo, bem como uma possível mudança conformacional à formação desse, tal como sugerido pelos ensaios de espectro-diferença em 215 e 280 nm, foi utilizado a sonda hidrofóbica 1-anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS).

A excitação do corante não ligado a 380 nm resulta numa baixa emissão fluorescente com um máximo a 545 nm. A intensidade de fluorescência do ANS aumenta quando o corante se liga às regiões hidrofóbicas de uma proteína [73]. O complexo proteína-ANS possui um espectro de emissão que é deslocado para um máximo amplo em 470 nm.

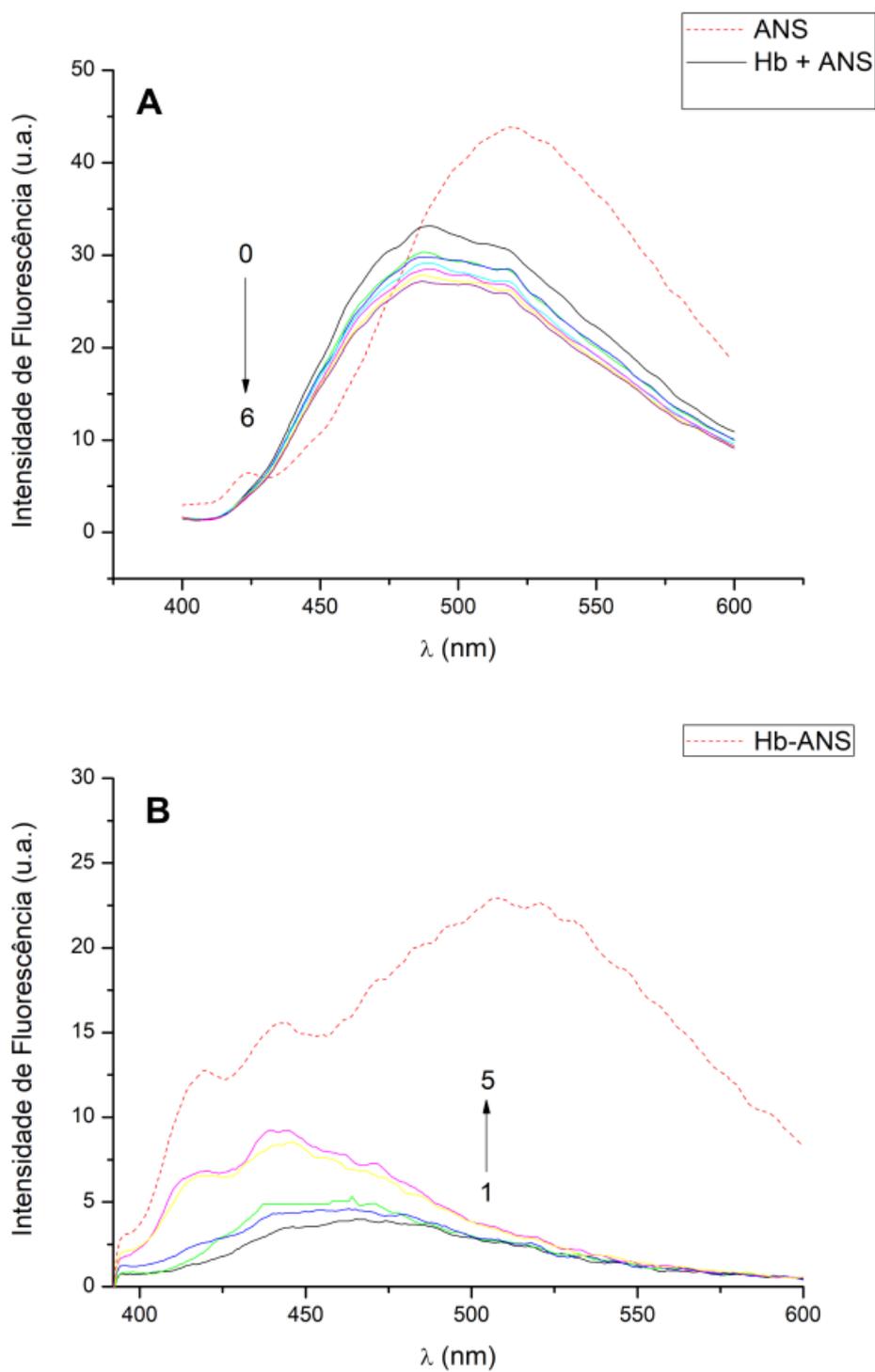
Para esta análise, dois métodos foram utilizados (figura 23). Num primeiro, o ANS livre foi adicionado a proteína e ao complexo Hb-DA, Já no segundo método, preparou-se soluções de proporções 1:1 e 1:10 do complexo Hb-ANS, titulando-as em seguida com alíquotas crescentes de DA, com o intuito de observar se a DA desloca o ANS.

A dependência da ligação de ANS na interação eletrostática entre o grupo sulfonato e os grupos catiônicos proteicos indica que a ligação de ANS requer locais hidrófilos preexistentes nas moléculas de proteína para iniciar a reação de ligação [74]. Além disso, a fluorescência do ANS é extinguida pela água, do que se conclui que a fluorescência é profundamente afetada se ocorrer uma mudança na hidratação da proteína ou a acessibilidade do ANS à água durante a ligação [73].

Com base nos resultados apresentados na figura 23-A, a dopamina interferiu na ligação do ANS com a proteína, o que pode ser observado pelo decréscimo de seu sinal indicativo de uma maior exposição do corante ao solvente. Já na figura 23-B pode-se observar que o sinal do ANS aumentou conforme dopamina foi adicionada à solução, indicando um deslocamento do mesmo.

Tais resultados reforçam que interações hidrofobias estejam envolvidas na ligação Hb-DA, tal como obtido pelo tratamento de Van't Hoff de dados fluorimétricos, embora não se tenha observado pelo ensaio com a sonda alterações conformacionais significativas. Nesse sentido, essa última observação corrobora a pequena variação de sinal encontrada para exposição de resíduos aromáticos na proteína, tal como referenciado pela figura 10.

Figura 23 - Emissão de fluorescência dos complexos Hb-DA e Hb-ANS.

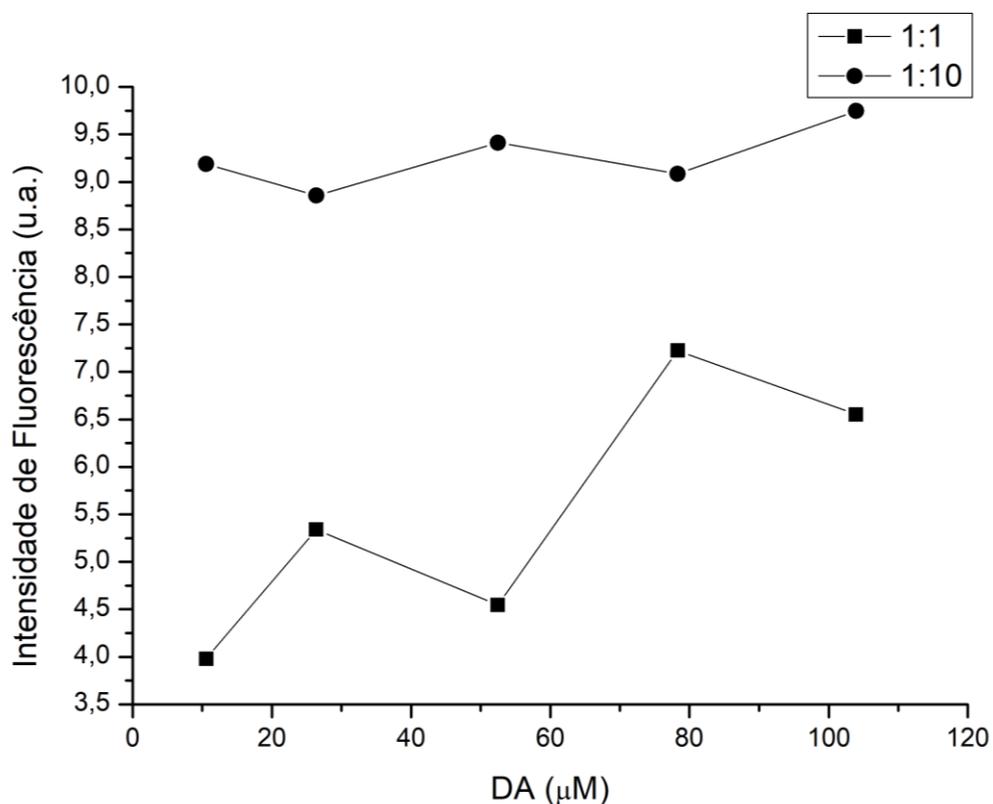


Fonte: Autoral

Legenda: A) ANS ( $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) sobre o complexo Hb-DA. Concentrações crescentes de DA, 0-6: de 0 a  $370 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . B) concentração crescente de DA, 1-5: de 0,1 a  $1,04 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , sobre o complexo Hb-ANS, ( $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ )  $n^\circ = 1$ .

Para se avaliar complementarmente esse comportamento hidrofóbico da interação, foi realizado um ensaio de titulação fluorimétrica com variação da proporção Hb-ANS. Como pode ser observado na Fig. 24, no complexo Hb-ANS 1:1 houve uma mudança dos picos de absorção, indicando que houve um deslocamento do ANS pela DA. Já no complexo 1:10, não houve mudança significativa, indicando que houve uma saturação de ANS impedindo seu deslocamento pela dopa. Dessa forma, sugere-se que a sonda hidrofóbica ANS foi deslocada pela dopamina, mas apenas em baixa concentração daquela.

Figura 24 - Intensidade dos picos em 315 nm na titulação do complexo Hb-ANS nas proporções de 1:1 e 1:10 em concentrações crescentes de DA: de 0,1 a 1,04  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , ( $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ )  $n^{\circ} = 1$ .

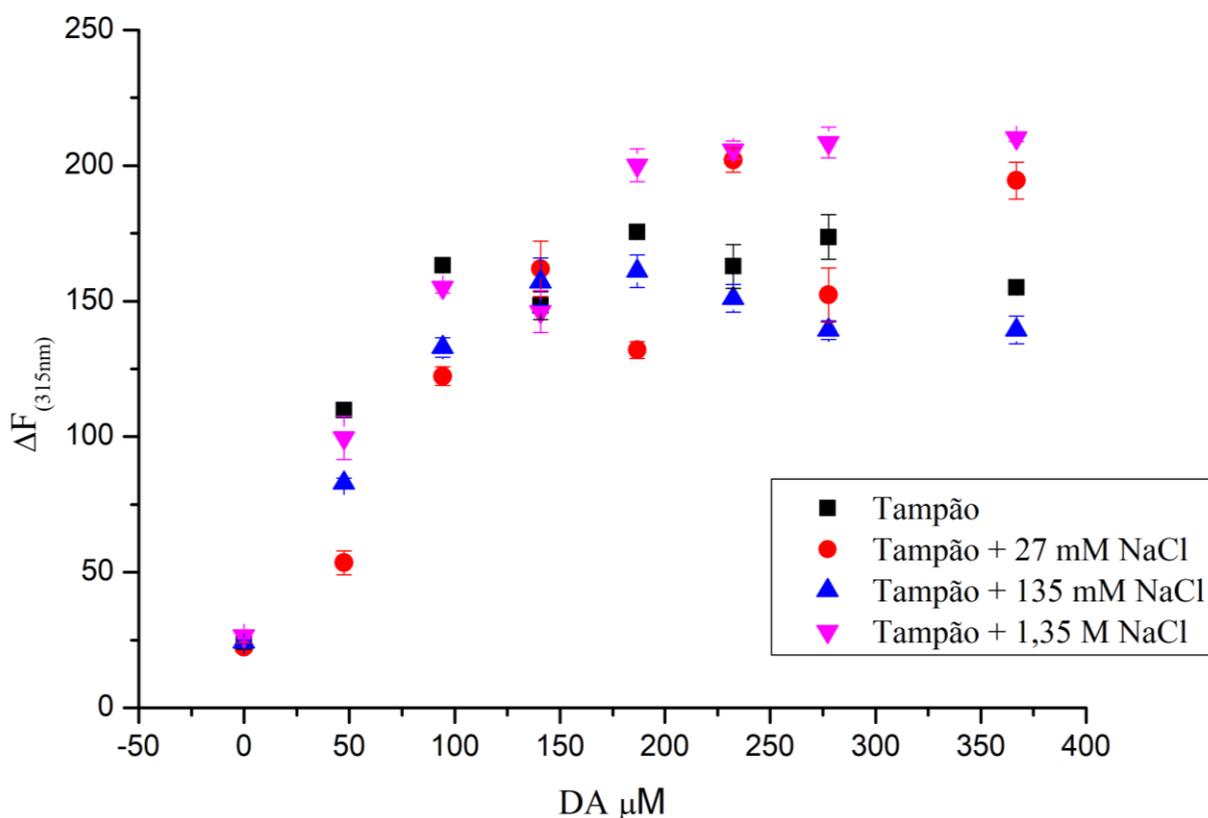


Fonte: Autoral

### 5.3.2 Efeito salino

Com a interação sugerida como entropicamente dirigida, buscou-se avaliar a participação de forças secundárias ao complexo, tais como interações iônicas, variando-se a concentração NaCl. Pelos resultados ilustrados na Figura 25 é perceptível que não houve pouca influência de interações iônicas na formação do complexo, entretanto o aumento da força iônica pode ter favorecido a interação hidrofóbica, inso devido a uma menor quantidade água nas interfaces de DA e Hb.

Figura 25 - Titulação de Hb com concentrações crescentes de DA: de 0 a 3,17  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  em diferentes concentrações de NaCl: de 0 a 1,35  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .



Fonte: Autoral

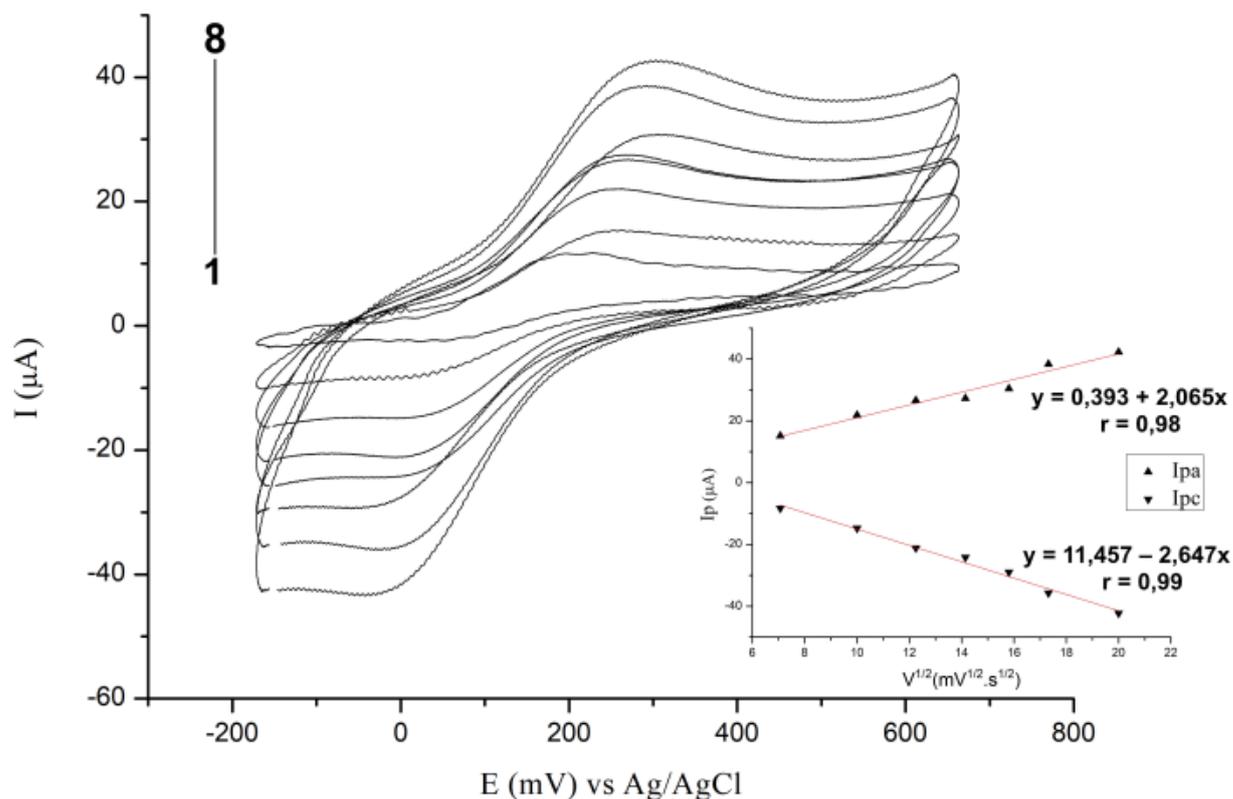
## 5.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Em paralelo às observações espectroscópicas de contribuição da proteína (absorção molecular) e do ligante (espectrofluorimetria), buscou-se um procedimento alternativo para a medida da interação, posto que nas técnicas anteriores a contribuição respectiva de ligante e proteína podem sobrepor-se aos sinais obtidos, exigindo-se procedimentos para eliminação desses. Dessa forma, utilizou-se a técnica eletroquímica de voltametria cíclica (VC), capaz de revelar alterações na disponibilidade de dopamina em solução, porém sem contribuição da proteína, característica da técnica. De fato, a identificação de Hb por esta requer derivatização da proteína, uso de membranas semipermeáveis ou eletrodos modificados [75].

### 5.4.1 Caracterização eletroquímica de DA e variação de pH

A Figura 26 apresenta os resultados dos ensaios de voltametria cíclica de dopamina. Através do voltamograma foram observados os potenciais de pico de oxidação e redução desta molécula orgânica em 233 mV e 11 mV respectivamente, a uma velocidade de varredura de 100 mV/s. O valor de  $E^{\circ}$  calculado foi de 122 mV. O valor de  $E_{pa}$  encontrado é bem próximo ao encontrado na literatura de 215 mV [76, 77]. Como um todo a figura sugere um modo quase reversível para o analito, frente a fuga da relação unitária de  $I_{pa}/I_{pc}$ .

Figura 26 - Voltamogramas cíclicos de dopamina a  $318 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato pH 7,4 em diferentes velocidades de varreduras 1-8: 10 a 400 mV/s. Inseto: relação linear prevista pelo modelo de Randles-Sevcic para sistemas difusionais puros,  $n^\circ = 1$ .

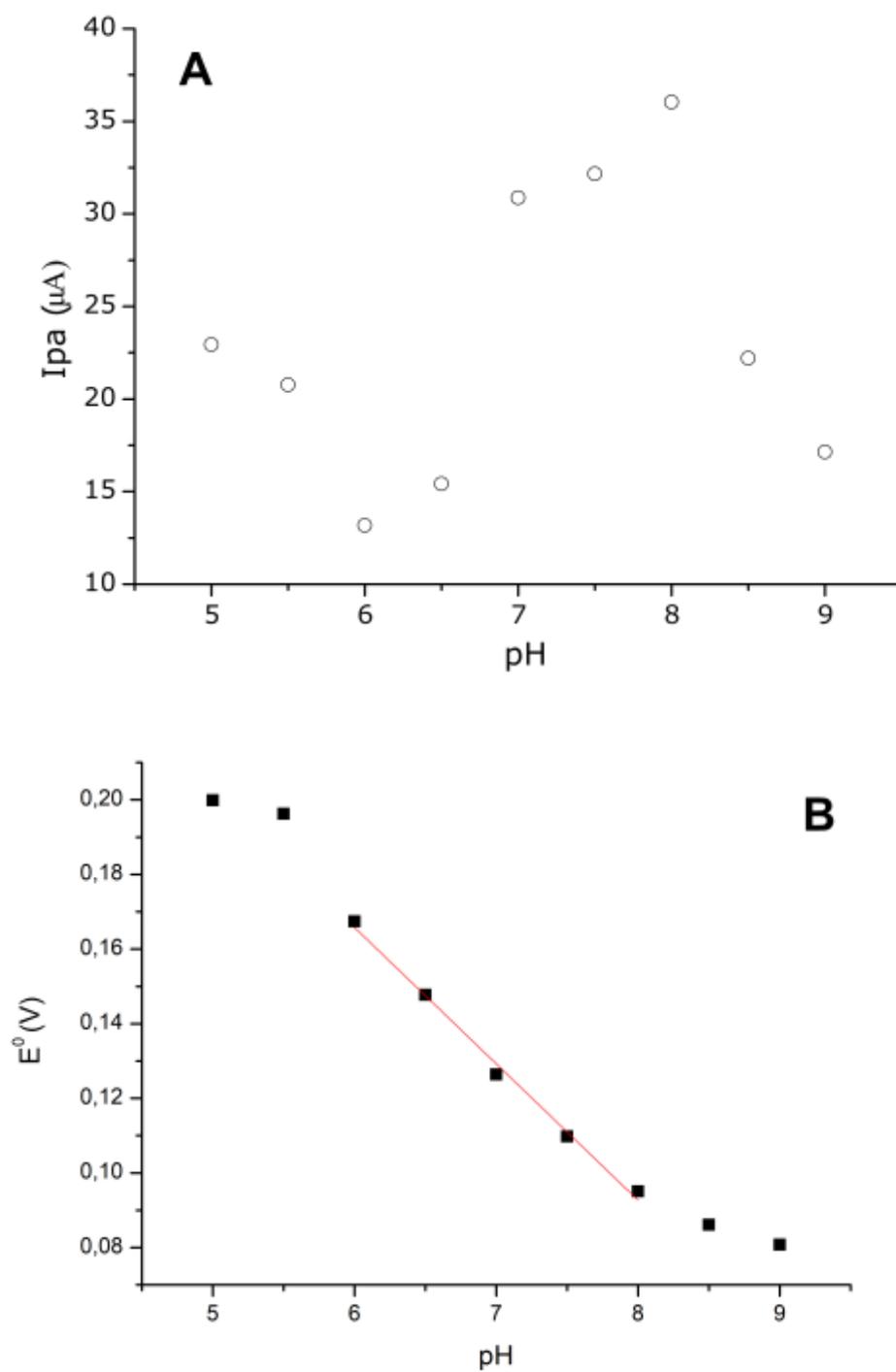


Fonte: Autoral

O inserto da figura 26 indica que o processo de oxirredução da dopamina foi difusional, sem fenômenos de superfície, tais como adsorção da molécula ao eletrodo ou formação de filmes sobre esse [78]. Além disso, a reação de oxirredução parece ter ocorrido com desproporcionamento, com transferência de carga ligada à liberação de prótons.

Os resultados de variação de corrente em função da concentração hidrogeniônica estão representados na figura 27. A figura 27-A parece reforçar o que foi obtido pelas figuras 12 de espectroscopia do complexo, uma vez que se pode identificar a faixa fisiológica como predominante na formação do sistema Hb-DA. Em adição, e conforme a figura 27-B, obteve-se uma inclinação no ponto médio da curva de variação de pH de 36 mV, sugerindo a participação de 2 elétrons e 1 próton para o sistema [79].

Figura 27 - Corrente (A) e potencial formal padrão (B) obtidos para a dopamina a  $318 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em diferentes pHs,  $n^\circ = 1$ .

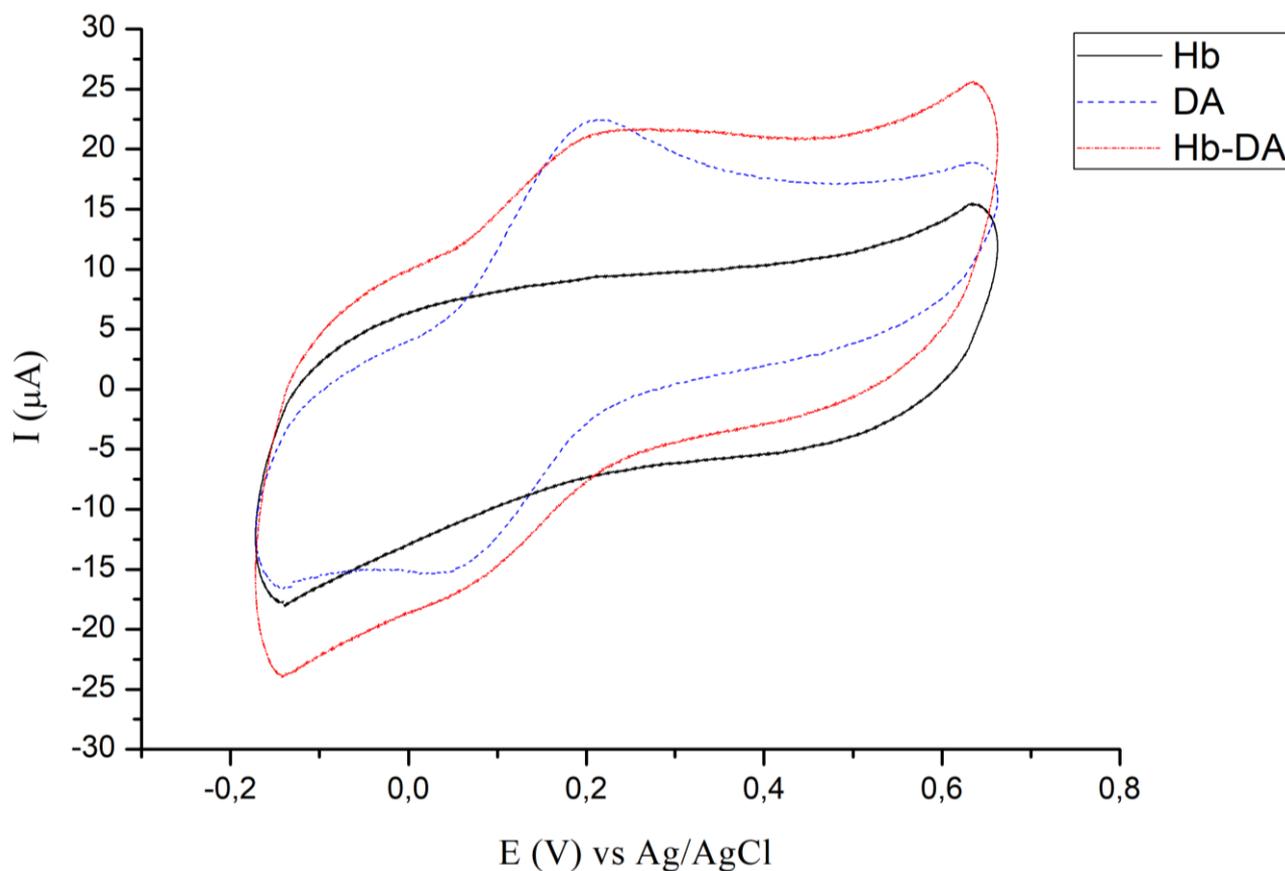


Fonte: Autoral

### 5.4.2 Interação Hemoglobina-Dopamina

A interação da DA com Hb foi também avaliada por VC, dado que o método permite aferir alterações nas reações de oxirredução do analito frente a proteína, com eliminação de sinal de fundo (*background*) promovido por essa, contrariamente aos procedimentos espectrais anteriores, como apresentado na figura 28.

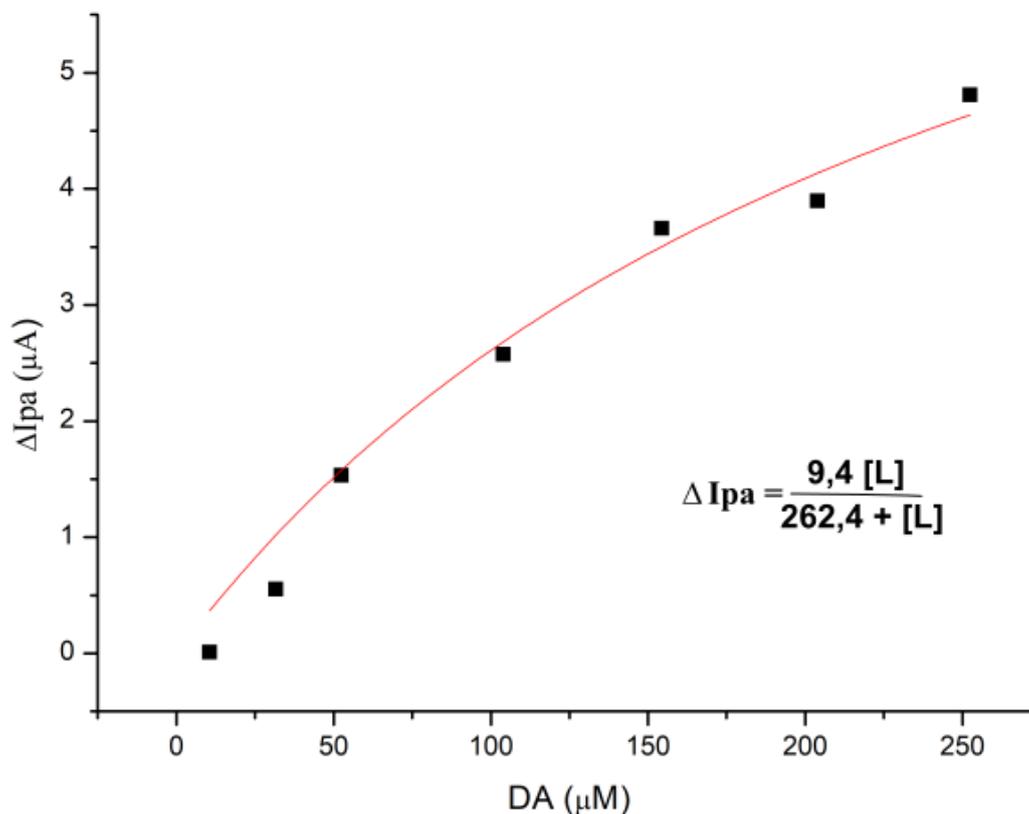
Figura 28 - Ciclovoltagemogramas de DA  $106 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ , Hb a  $77,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e do complexo Hb-DA.



Autor: Autoral

Titulando-se a dopamina sobre soluções de Hb, foi possível obter os sinais amperométricos de diferença que atestam a formação do complexo, conforme apresentado na Figura 29. Por regressão não-linear (equação 2) aos dados, foi possível calcular um  $K_d = 262,4 \pm 87,8 \mu\text{M}$ , bem próximo aos obtidos junto aos dados por absorção e fluorimétricos que são técnicas bem distintas, confirmando a interação Hb-DA.

**Figura 29** - Isoterma de interação de DA: de 10 a 252  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  a com Hb a 77,4  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  tal como observado pelo sinal de diferença amperométrica do sistema por voltametria cíclica,  $n^\circ = 1$ .



Fonte: Autoral

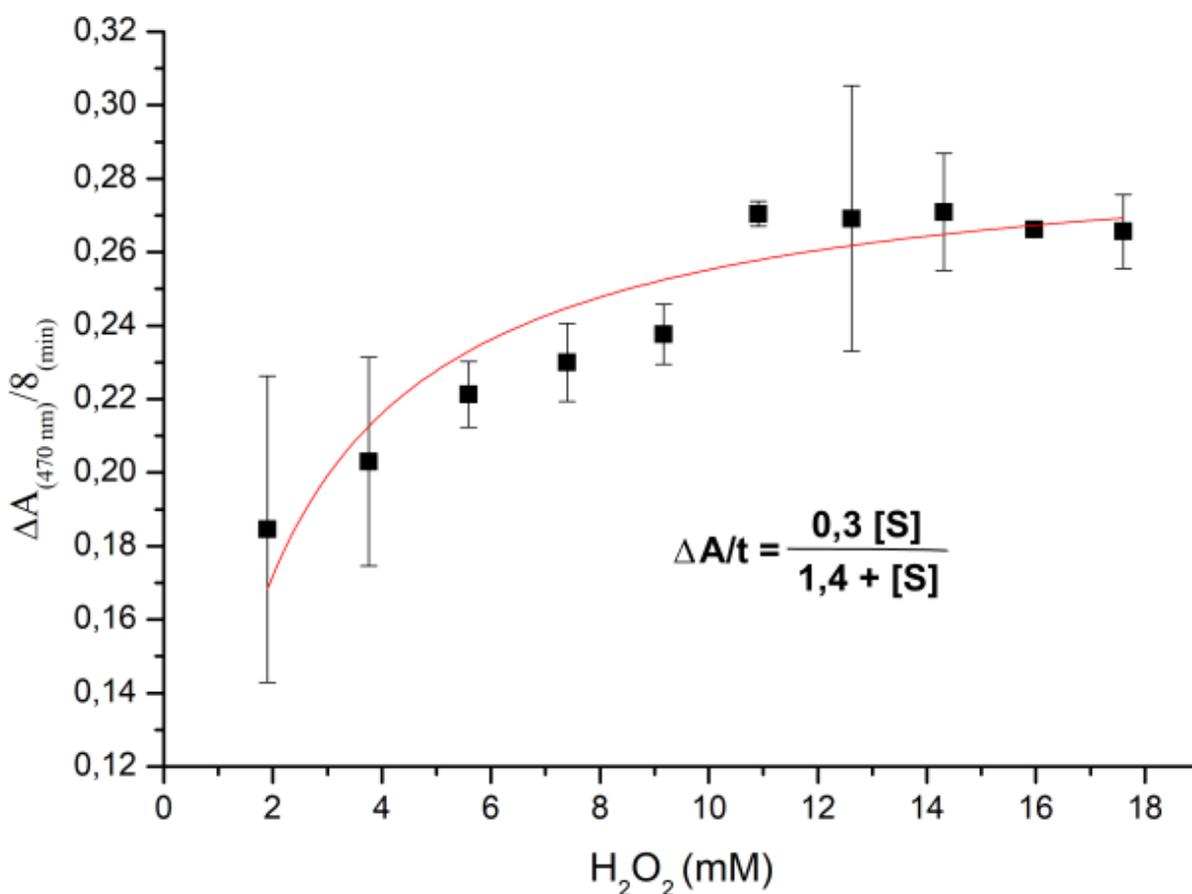
## 5.5 ATIVIDADE PEROXIDÁSICA DA HEMOGLOBINA E DO COMPLEXO HB-DA

O conhecimento de que a hemoglobina possui propriedades peroxidásica foi relatado a primeira vez por Tappel em 1953 que por meio de estudos *in vitro* mostrou que a metahemoglobina e a metamioglobina podem reagir com hidroperóxidos lipídicos preexistentes para produzir radicais livres associados a lipídios [26, 80]. A atividade de peroxidase de ambas as subunidades ( $\alpha\beta$ ) mostrou-se reduzida em relação ao tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  e verificou-se que a oxidação do *heme* estava associada a uma diminuição dessa atividade [80].

O uso do guaiacol com substrato doador de elétrons já descrito por diversos autores [24, 27 34, 80, 81, 82, 83], por meio de espectro-diferença do sinal do produto da oxidação de guaiacol em tetraguaiacol em 470 nm. Dessa forma, procedeu-se à

construção de uma curva analítica para ajuste das concentrações adequadas de guaiacol e peróxido. O resultado apresentado na figura 30 para atividade peroxidásica da Hb indicou uma saturação da atividade peroxidásica de Hb, com um valor de  $K_m$  aparente para a reação por regressão não-linear (equação 2) de  $1,4 \text{ mM} \pm 0,5$ . O ensaio foi conduzido em tampão acetato, uma vez que o "tampão fosfato é conhecido como um potencial inibidor da atividade da peroxidase, atuando como eliminador de radicais livres" [83].

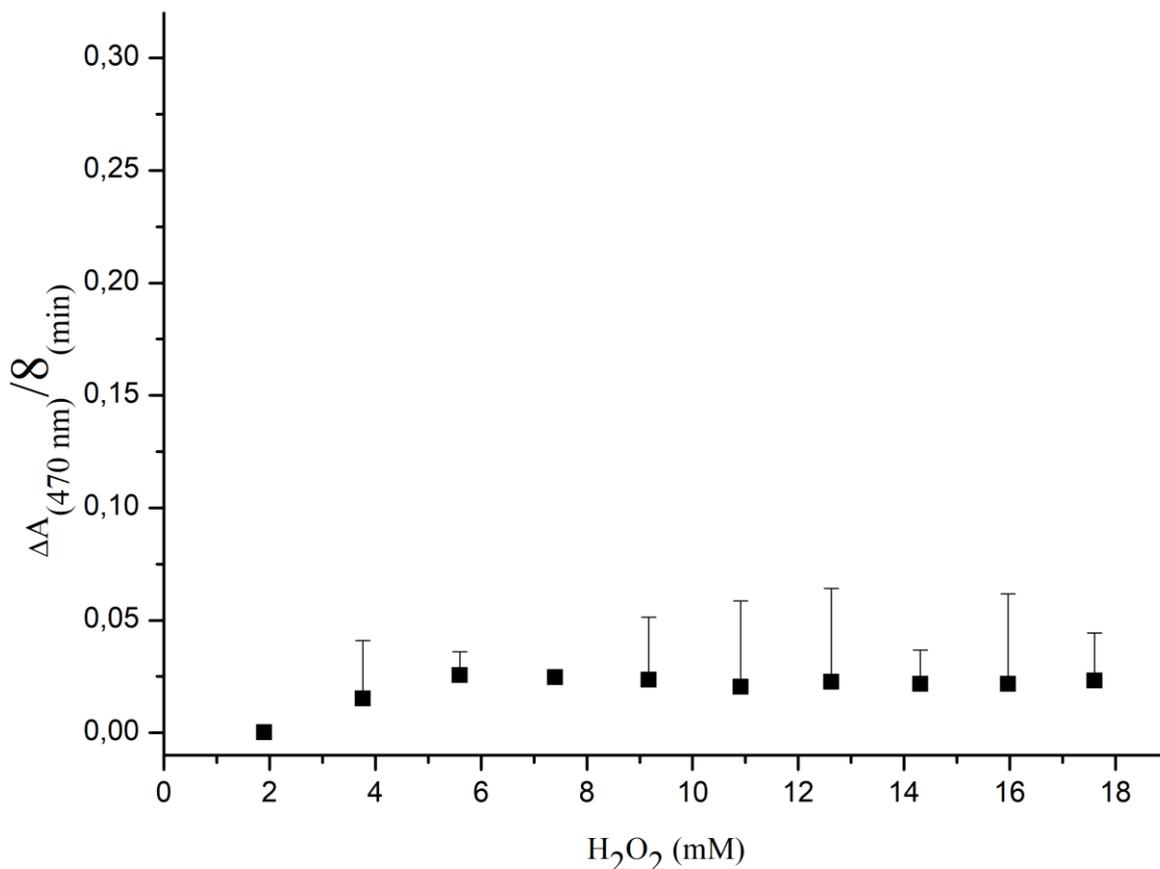
Figura 30 - Atividade peroxidativa de Hb  $3,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em função da concentração de peróxido de hidrogênio na faixa de 1,9 a  $17,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  em tampão acetato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 5 a  $25^\circ\text{C}$ .



Fonte: Autoral

Os resultados apresentados na figura 31 para o complexo Hb-DA frente a atividade peroxidativa da Hb indicam que a dopamina afetou sua atividade de redução sobre o peróxido de hidrogênio. Segundo Everse e Fedeli [24, 79] a dopamina também pode servir como transferidor de carga para Hb na redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , tendo esta uma afinidade superior ao guaiacol pela proteína.

Figura 31 - Atividade peroxidativa de Hb-DA em função da concentração de peróxido de hidrogênio na faixa de 1,9 a 17,6 mmol.L<sup>-1</sup> em tampão acetato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 5 a 25°C. Com guaiacol como substrato.



Fonte: Autoral

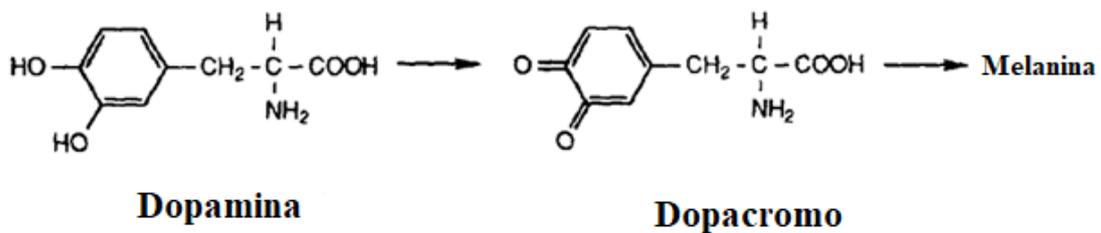
Em conjunto esses resultados sugerem que DA pode afetar a atividade biológica de Hb no estresse oxidativo existente em neurônios dopaminérgicos durante o estresse oxidativo celular [1, 81].

Com base nisto, tentamos determinar o teor de oxigênio nas soluções de Hb, DA e complexo Hb-DA (concentração relativa ao  $K_d$ ), afim de avaliar se a associação de DA a Hb poderia também alterar as propriedades de combinação ao O<sub>2</sub> pela proteína. Não dispondo de um oxígrafo para efetuar a medida, partimos para a construção de eletrodo de Clark para medidas de oxigênio dissolvido por cronoamperometria. Contudo, não obtivemos êxito até o presente para a detecção reprodutiva de O<sub>2</sub> dissolvido pelo método na presença de DA, como explicitado ao Apêndice 1.

A dopamina é oxidada a dopacromo na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 32). O dopacromo pode então reagir com outras moléculas de dopamina e dopacromo, e eventualmente formar a melanina insolúvel, cuja estrutura varia com as condições da

reação. Desta forma tornando difícil se determinar um coeficiente de extinção confiável por absorção molecular para o produto de oxidação da dopamina, assim como de muitos outros dos substratos de peroxidase [26].

Figura 32 - Esquema representativo da oxidação da dopamina a Melanina.



Fonte: Adaptado de EVERSE, J.; JONSON, M.C.; MARINI, M.A, 1994.

## 6 CONCLUSÃO

A formação do complexo Hemoglobina-Dopamina foi confirmada pelos três métodos utilizados neste trabalho. Por meio das curvas de saturação foi possível calcular um  $K_d$  médio de  $273,7 \pm 12,3 \mu\text{Mol.L}^{-1}$  para a interação, que ocorre de forma não cooperativa. A espectrofluorimetria se apresentou como um método superior para aferir a formação do complexo, no qual a extinção da fluorescência da interação ocorreu de forma estática, sendo desfavorecida com o aumento da temperatura, também foi possível por meio do tratamento proposto pela equação de Van't Hoff concluir que o efeito hidrofóbico desempenhou papel principal na ligação Hb-DA. Variações de pH e NaCl demonstraram ter pouco influência sobre o mesmo, entretanto o aumento da força iônica pode ter favorecido a interação hidrofóbica. A formação do complexo aparenta ter tido efeito negativo na temperatura de desnaturação da proteína. Os resultados obtidos com a sonda hidrofóbica ANS não evidenciam alterações conformacionais significativas para a estrutura da Hb, entretanto contribuem para afirmar que o efeito hidrofóbico desempenha papel na interação. Os dados sobre atividade peroxidásica mostra que a dopamina teve efeito negativo frente a hemoglobina sob o transferidor guaiacol, sugerindo a que a dopamina possa interferir na resposta biológica de Hb em células neuronais dopaminérgicas. Contudo o presente trabalho abre portas para melhor compreensão da interação de Hb com o neurotransmissor dopamina bem como seu papel no estresse oxidativo associado a doenças neurodegenerativas e a possibilidade de estudo de sua interação com outros neurotransmissores.

## REFERÊNCIAS

- [1] STOKES, A. H.; HASTINGS, T. G.; VRANA, K. E. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. **Journal of neuroscience research**, v. 55, n. 6, p. 659-665, 1999.
- [2] RUSSO, R. *et al.* Hemoglobin is present as a canonical  $\alpha_2\beta_2$  tetramer in dopaminergic neurons. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 9, p. 1939-1943, 2013.
- [3] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.
- [4] SEMEDO, M. S. S. de C. **Utilização de derivados de calixarenos no isolamento de proteínas e biocatálise em solventes orgânicos**. 2007. 115p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica Aplicada) Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.
- [5] BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- [6] BIAGIOLI, M. *et al.* Unexpected expression of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 36, p. 15454, 2009.
- [7] POEWE, Werner *et al.* Parkinson disease. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.
- [8] NAVARRO-PETERNELLA, F. M.; MARCON, S. S. Qualidade de vida de indivíduos com Parkinson e sua relação com tempo de evolução e gravidade da doença. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 20, n. 2, p. 384, 2012.
- [9] HIRSCH, E.; GRAYBIEL, A. M.; AGID, Y. A. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. **Nature**, v. 334, n. 6180, p. 345, 1988.
- [10] MEYER-LINDENBERG, A. *et al.* Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 267, 2002.
- [11] CARMO, T. P. S.; FERREIRA, C. C. D. Avaliação nutricional e o uso da Levodopa com refeições proteicas em pacientes com doença de Parkinson do município de Macaé, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 2, 2016.
- [12] CALBREATH, D. F. **Clinical chemistry: a fundamental textbook**. Philadelphia : W. B. Saunders, 1992. cap.16, p.339.

- [13] SURMEIER, D. J.; OBESO, J. A.; HALLIDAY, Glenda M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 101, 2017.
- [14] LIU, X. *et al.* Formation of dopamine adducts derived from brain polyunsaturated fatty acids mechanism for Parkinson disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 50, p. 34887-34895, 2008.
- [15] BOVÉ, J. *et al.* Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx**, v. 2, n. 3, p. 484, 2005.
- [16] GÖTZ, M. E. *et al.* Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. **Pharmacology & therapeutics**, v. 63, n. 1, p. 37, 1994.
- [17] HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link?. **Experimental neurology**, v. 193, n. 2, p. 279, 2005.
- [18] LAVOIE, M. J.; HASTINGS, T. G. Peroxynitrite-and nitrite-induced oxidation of dopamine: implications for nitric oxide in dopaminergic cell loss. **Journal of neurochemistry**, v. 73, n. 6, p. 2546, 1999.
- [19] BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P.; DEEBLE, D. J. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. **Free Radical Biol. Med.**, n.13, p. 391, 1992.
- [20] GRAHAM, D. G. *et al.* Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro, **Mol. Pharmacol**, n. 14, p. 644, 1978.
- [21] BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2014.
- [22] SAFO, M. K.; DONALD J. A. "The X-ray structure determination of bovine carbonmonoxy hemoglobin at 2.1 Å resolution and its relationship to the quaternary structures of other hemoglobin crystal forms." **Protein Science**, v. 10, n. 6, p.1099, 2001.
- [23] SCHNEEDORF FS, J. M. **Bioquímica Estrutural guiada por Jmol**. 1 ed. Alfenas, MG: UNIFAL, 2019. Ebook.
- [24] CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.
- [25] KINNUNEN, A. *et al.* Improved efficiency in screening for lignin-modifying peroxidases and laccases of basidiomycetes. **Current Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 105-115, 2017.
- [26] EVERSE, J.; JOHNSON, M. C.; MARINI, M. A. Peroxidative activities of hemoglobin and hemoglobin derivatives. **Methods in enzymology**, Academic Press, p. 547, 1994.

- [27] CARUSO, C. S. *et al.* Metals content of *Glossoscolex paulistus* extracellular hemoglobin: Its peroxidase activity and the importance of these ions in the protein stability. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 161, p. 63-72, 2016.
- [28] VLASITS, J. *et al.* Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, n. 1, p. 74-81, 2010.
- [29] RICHTER, F. *et al.* Neurons express hemoglobin  $\alpha$ -and  $\beta$ -chains in rat and human brains. **Journal of Comparative Neurology**, v. 515, n. 5, p. 538-547, 2009.
- [30] TORRÃO, A. S. *et al.* Abordagens diferentes, um único objetivo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e de Alzheimer. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 34, n. supplement 2, p. 194, 2012.
- [31] GOMES, I. *et al.* Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules. **The AAPS journal**, v. 12, n. 4, p. 658-669, 2010.
- [32] SCHNEEDORF, J. M., SANTORO, M. M., MARES-GUIA, M., Structural Displayed in the soluble phase of corystalization of flavianic acid with trypsin in acid media, **Biochimic**, v. 83, p. 497, 2001.
- [33] BAJPAI, P. B.; BASU, P. K.; BAUL, T. S. Binding of 5-(2'- azoquinolin-8-ol to bovine serum albumin: a spectroscopic study , **Spectrochimica Acta A**, v. 56, p.2453, 2000.
- [34] FARDE, L. *et al.* Quantitative analysis of D2 dopamine receptor binding in the living human brain by PET. **Science**, v. 231, n. 4735, p. 258, 1986.
- [35] CARNEIRO, F. A.; FERRADOSA, A. S.; DA POIAN, A. T. Low pH-induced conformational changes in vesicular stomatitis virus glycoprotein involve dramatic structure reorganization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 62, 2001.
- [36] ABDALLA, D. S. P. **Determinação cinética da haptoglobina sérica em portadores de anemias hemolíticas, cirrose e hepatite viral.** 1981. 130f. Dissertação (Mestrado em Farmácia e Bioquímica) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1981.
- [37] Bhattacharjee, Sourav. "DLS and zeta potential–what they are and what they are not?." **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337, 2016.
- [38] Origin(Pro), Version 8.5 (September 15, 2010). **OriginLab Corporation**, Northampton, MA, USA.
- [39] PAVIA, D. L. *et al.* **Introduction to spectroscopy.** Massachusetts: Cengage Learning, 2008.
- [40] MAITRA, S. *et al.* Alprazolam induced conformational change in hemoglobin. **International journal of biological macromolecules**, v. 41, n. 1, p. 23, 2007.

- [41] CHATTERJEE, S.; KUMAR, G. S. Targeting the heme proteins hemoglobin and myoglobin by janus green blue and study of the dye–protein association by spectroscopy and calorimetry. **RSC Advances**, v. 4, n. 80, p. 42706, 2014.
- [42] ISBISTER, G. K. *et al.* Alprazolam is relatively more toxic than other benzodiazepines in overdose. **British journal of clinical pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 88-95, 2004.
- [43] SAFO, M. K. *et al.* Hemoglobin–ligand binding: Understanding Hb function and allostery on atomic level. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 6, p. 797-809, 2011.
- [44] LINHARES FILHO, J. P. P. *et al.* P2265 Impact of glycated hemoglobin in diabetic patients with coronary artery disease undergoing surgery, angioplasty or clinical treatment in a very long-term follow-up. **European Heart Journal**, v. 39, n. suppl-1, p. 565, 2018.
- [45] MAKARSKA-BIALOKOZ, M. Analysis of the binding interaction in uric acid-Human hemoglobin system by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 178, p. 47, 2017.
- [46] CHAKRABORTY, S. *et al.* A critical study on the interactions of hesperitin with human hemoglobin: Fluorescence spectroscopic and molecular modeling approach. **Journal of luminescence**, v. 132, n. 6, p. 1522, 2012.
- [47] MANDAL, P.; BARDHAN, M.; GANGULY, T. A detailed spectroscopic study on the interaction of Rhodamine 6G with human hemoglobin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 99, n. 2, p. 78, 2010.
- [48] WANG, Y. *et al.* Studies of the interaction between paraquat and bovine hemoglobin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 3, p. 243, 2007.
- [49] LI, H. *et al.* Studies of the interaction between FNC and human hemoglobin: A spectroscopic analysis and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 416, 2015.
- [50] WANG, Y. *et al.* Binding interactions of MoS<sub>2</sub> quantum dots with hemoglobin and their adsorption isotherms and kinetics in vitro. **Journal of Molecular Liquids**, v. 275, p. 304, 2019.
- [51] AJLOO, D. *et al.* Comparative structural and functional studies of avian and mammalian hemoglobins. **ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION-**, v. 49, n. 2, p. 459, 2002.
- [52] YUAN, T. WELJIE, A. M. VOGEL, H. Tryptophan Fluorescence Quenching by Methionine and Selenomethionine Residues of Calmodulin: Orientation of Peptide and Protein Binding. **Biochemistry**, n. 37, v. 9, p.3187, 1998.

- [53] YANG, C. *et al.* "The performance of the Benesi-Hildebrand method in measuring the binding constants of the cyclodextrin complexation." **Analytical sciences**, 16, 5, p.537, 2000.
- [54] BANSAL, S. *et al.* A study of the interaction of bovine hemoglobin with synthetic dyes using spectroscopic techniques and molecular docking. **Frontiers in chemistry**, v. 4, p. 50, 2017.
- [55] DAHLQUIST, F. W. The meaning of scatchard and hill plots. **Methods in enzymology**, Academic Press, Vol. 48, p. 270, 1978.
- [56] SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 51, n. 4, p. 660, 1949.
- [57] U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, National Center for Biotechnology Information. **Dopamine**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dopamine> Acesso em: 01 Aug. 2019.
- [58] BUNN, H. F. The separation of human and animal hemoglobins by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 229, n. 1, p. 42, 1971.
- [59] BRANDENBURG, K. *et al.* Cross-linked hemoglobin converts endotoxically inactive pentaacyl endotoxins into a physiologically active conformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 48, p. 47660, 2003.
- [60] JAJROUD, S. Y. M.; FALAHATI, M.; ATTAR, F.; KHAVARI-NEJAD, R. A. Human hemoglobin adsorption onto colloidal cerium oxide nanoparticles: a new model based on zeta potential and spectroscopy measurements. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1, 2017.
- [61] HAYAT, A.; ANDREESCU, D.; BULBUL, G.; ANDREESCU, S. Redox reactivity of cerium oxide nanoparticles against dopamine. **Journal of Colloid and Interface Science**, 418, p. 240, 2014.
- [62] BHATTACHARYA, *et al.* Unfolding of hemoglobin variants—insights from urea gradient gel electrophoresis photon correlation spectroscopy and zeta potential measurements. **Analytica Chimica Acta**, 522, 2, p. 207, 2004.
- [63] VENKATESHRAO, S.; MANOHARAN, P. T. Conformational changes monitored by fluorescence study on reconstituted hemoglobins. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 60, n. 11, p. 2523-2526, 2004.
- [64] WANG, H. Y.; SUN, Y.; TANG, B.. Study on fluorescence property of dopamine and determination of dopamine by fluorimetry. **Talanta**, v. 57, n. 5, p. 899, 2002.
- [65] PÉREZ-RUIZ, T. *et al.* Determination of proteins in serum by fluorescence quenching of Rose Bengal using the stopped-flow mixing technique. **Analyst**, v. 125, n. 3, p. 507, 2000.

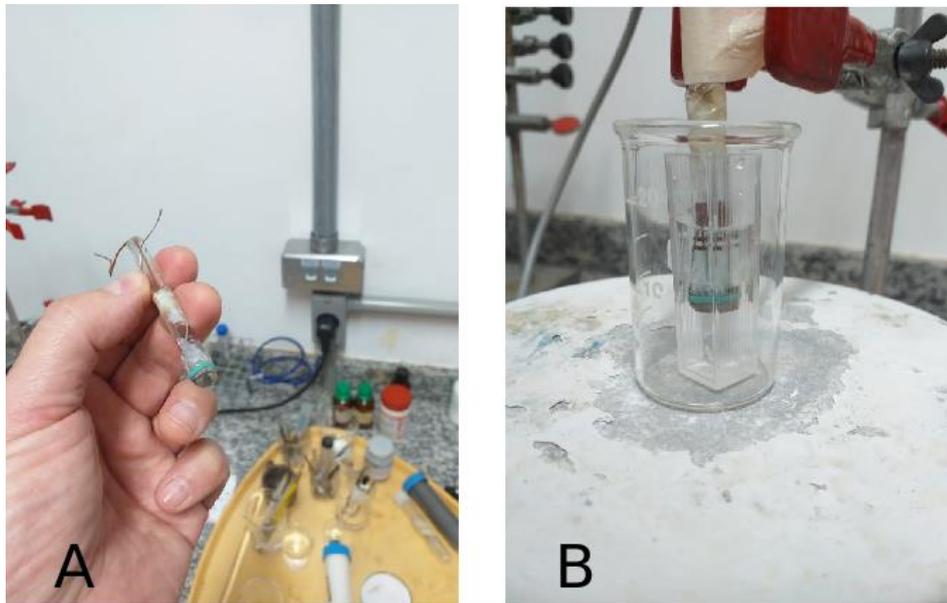
- [66] CHATTERJEE, S.; KUMAR, G. S. Binding of fluorescent acridine dyes acridine orange and 9-aminoacridine to hemoglobin: elucidation of their molecular recognition by spectroscopy, calorimetry and molecular modeling techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 169, 2016.
- [67] SEN, S.; PAUL, B. K.; GUCHHAIT, N. Binding interaction of phenazinium-based cationic photosensitizers with human hemoglobin: Exploring the effects of pH and chemical structure. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 186, p. 88, 2018.
- [68] LAKOWICZ, Joseph R. (Ed.). **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer, 2013.
- [69] MILLAN, S. *et al.* Exploring the effect of 5-fluorouracil on conformation, stability and activity of Lysozyme by combined approach of spectroscopic and theoretical studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 179, p. 23, 2018.
- [70] KHAN, A. Y.; KUMAR, G. S. Probing the binding of anticancer drug topotecan with human hemoglobin: Structural and thermodynamic studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 163, p. 185-193, 2016.
- [71] WANG, R. *et al.* Study of the interaction between bovine hemoglobin and analogs of biphenyldicarboxylate by spectrofluorimetry. **Journal of luminescence**, v. 144, p. 79, 2013.
- [72] ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096-, 1981.
- [73] MATULIS, D *et al.* 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 49, n. 6, p. 451, 1999.
- [74] MATULIS, D; LOVRIEN, R. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 1, p. 422, 1998.
- [75] SALIMI, A.; HALLAJ, R.; SOLTANIAN, S. Immobilization of hemoglobin on electrodeposited cobalt-oxide nanoparticles: direct voltammetry and electrocatalytic activity. **Biophysical chemistry**, v. 130, n. 3, p. 122, 2007.
- [76] ARDAKANI, M. M. *et al.* Electrochemical and catalytic investigations of dopamine and uric acid by modified carbon nanotube paste electrode. **Bioelectrochemistry**, n.75, p.1, 2009.
- [77] FERREIRA, C. A. **Complexos de Dopamina com Albumina como modelo para etiquetagem eletroquímica de proteínas desprovidas de centros redox metálicos**. 2010. 103f. Dissertação (Mestrado em Química: Físico-Química). Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2010.

- [78] SANTOS, S. X. **Aplicação de eletrodos compósitos à base de borracha de silicone na determinação de substâncias de interesse farmacológico**. 2007. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências) -Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- [79] TOLEDO, R. A. de. **Estudo Eletroquímico e desenvolvimento de novas metodologias eletroanalíticas para a determinação de antidepressivos tricíclicos e neurotransmissores**. 2006. 172f. Tese (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- [80] FEDELI, D. *et al.* Hemoglobin components from trout (*Salmo irideus*): determination of their peroxidative activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 130, n. 4, p. 559, 2001.
- [81] LI, D. *et al.* Inactivation of hemoglobin by hydrogen peroxide and protection by a reductant substrate. **Life Sci. J**, v. 3, n. 1, p. 52-58, 2006.
- [82] TORRES, E.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Chemical modification of hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAHs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 3, p. 820, 2000.
- [83] SPOLITAK, T.; HOLLENBERG, P. F.; BALLOU, D. P. Oxidative hemoglobin reactions: Applications to drug metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 600, p. 33, 2016.
- [84] ACD/ChemSketch: Freeware. Totonto Canadá, 2019. Disponível em: <https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/download.php> Acesso em: 08 Aug. 2019
- [85] HERZIK, M. A.; WU, M.; LANDER, G. C. High-resolution structure determination of sub-100 kDa complexes using conventional cryo-EM. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1, 2019.

## **APÊNDICE A - Construção do eletrodo de Clark para oxigênio dissolvido.**

O sistema consistiu num eletrodo de Pt (cátodo, 0,25 mm diâmetro) soldado em fio de cobre internamente num fragmento de pipeta de vidro (10 x 1 cm) para contato com as garras jacaré do potenciostato, e num eletrodo de referência de Ag (ânodo, fio de prata 0,5 mm). À ponta de Pt foi adicionado 10 ul de solução 3M de KCl. Uma fina membrana isolante de teflon (PTFE) permeável ao oxigênio permitiu o isolamento elétrico da solução a analisar, também impedindo a deposição de substâncias susceptíveis de alterar a resposta dos elementos ativos do sistema. A membrana foi segura à base por um pequeno anel dental de borracha de modo a ficar perfeitamente aderente e em estreito contato com os eletrodos. Quando se polariza negativamente o eletrodo de Pt em relação ao eletrodo de referência, o O<sub>2</sub> dissolvido em solução sofre uma redução eletrolítica no cátodo, gerando-se uma corrente elétrica de baixa intensidade (figura 1). A solução eletrólito foi o tampão fosfato utilizado neste trabalho, tendo o equipamento PG-39MSCV (Omnimetra Instrum. Científicos Ltda, Nova Friburgo, RJ) conectado ao sistema por garras jacaré (WE e RE2 – fio em contato com Pt; RE1 e CE – fio em contato com Ag). A resposta elétrica foi monitorada em temperatura ambiente, e sob agitação magnética com auxílio de uma mini barra construída para tal (0,5 cm de diâmetro). Para o ensaio cronoamperométrico, foi aplicado um potencial de polarização de -0.7 V, seguindo-se o monitoramento da corrente resultante.

**Figura 1.** Construção do eletrodo tipo Clark para determinação de  $O_2$  dissolvido. A- eletrodo; B – sistema conectado ao potenciostato.

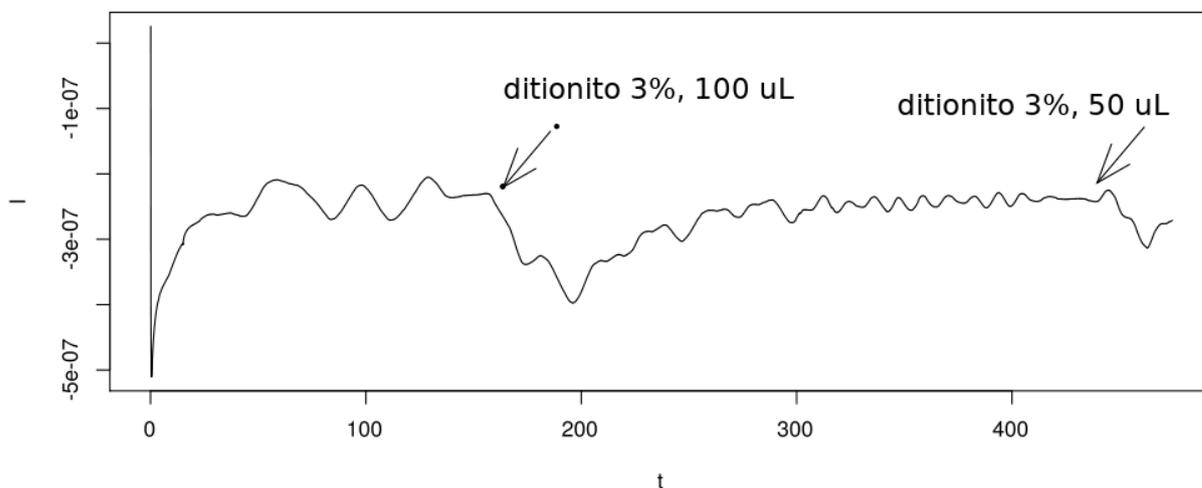


Fonte: Autoral

### Resultados preliminares:

Ainda que não tenhamos obtido resultados satisfatórios para o momento, frente a montagem e testes recentes do sistema, a figura 2 apresenta a evolução da resposta amperométrica em tampão antes e após a adição de alíquotas de ditionito sódico a 3%, composto que reagem com o oxigênio dissolvido, reduzindo a resposta amperométrica.

**Figura 2.** Resposta amperométrica em tampão antes e após a adição de alíquotas de ditionito sódico a 3%.



Fonte: Autoral



## APÊNDICE B – Resumo do Artigo publicado

### Interação Ligante-Proteína Monitorada por Espectrofotometria

#### *Ligand-protein interaction monitored by spectrophotometry*

Rafael Júnior de Andrade<sup>1\*</sup>, José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Alfenas – Unifal/MG, Alfenas/MG.

\*e-mail: rafaeljuniordeandrade@gmail.com

#### Resumo

Este trabalho descreve a elaboração de uma aula prática simples e de fácil realização para uso em aulas de Bioquímica. A prática consiste na utilização de um espectrofotômetro na faixa de luz visível para obtenção da constante de associação do complexo formado pelo equilíbrio da interação de um ligante (vermelho de fenol) com uma proteína (albumina sérica bovina, BSA). O parâmetro permite o cálculo da variação de energia de Gibbs da interação, e sua comparação com a literatura, permitindo ao aluno vivenciar na prática conceitos abstratos de difícil apropriação, tais como as quantidades termodinâmicas elencadas. A prática pode ser aplicada no período convencional de uma aula prática (60 min), incluindo a coleta de dados e quantificação dos parâmetros.

**Palavras-chave:** *Interação Ligante-Proteína; Biotermodinâmica; Energia de Gibbs.*

#### Abstract

This work describes the design of a simple and easy-to-perform laboratory class in Biochemistry course. This practice consists of utilizing a spectrophotometer working in the range of visible light to obtain the association constant of the complex, obtained by the equilibrium of the ligand interaction (phenol red) with a protein (Bovine Serum Albumin, BSA). The parameter allows the calculation of the Gibbs energy variation of this interaction, and its comparison to the literature. This is an opportunity for the students to experience, in practice, abstract concepts that are difficult to understand, such as the listed thermodynamics quantities. Including the data acquisition and parameters quantification, this class can be performed in 60 minutes, the same duration as an usual class.

**Keywords:** *Ligand-protein interaction; Biothermodynamics; Gibbs Energy.*

**APÊNDICE C – E-mail de comprovação de submissão de artigo sobre o trabalho**

11/02/2020

Gmail - Fwd: [RVq] Agradecimento pela Submissão



Rafael Júnior de Andrade &lt;rafaeljuniordeandrade@gmail.com&gt;

---

**Fwd: [RVq] Agradecimento pela Submissão**

---

**José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva** <zemasfs@gmail.com>  
Para: Rafael Júnior de Andrade <rafaeljuniordeandrade@gmail.com>

4 de fevereiro de 2020 09:44

----- Forwarded message -----

De: **Editoria da RVq** <rvq@sbq.org.br>  
Date: ter., 4 de fev. de 2020 às 09:14  
Subject: [RVq] Agradecimento pela Submissão  
To: Prof. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva <zemasfs@gmail.com>

Prof. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Equilíbrio e análise conformacional da interação de hemoglobina complexada a dopamina" para Revista Virtual de Química. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:  
<http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/author/submission/3663>  
Login: zemasfs

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Editoria da RVq  
Revista Virtual de Química  
Editoria RVq  
Revista Virtual de Química  
<http://rvq.sbq.org.br>

—

Prof. José Maurício Schneedorf FS  
Laboratório de Bioquímica, sala E209-C  
Fone: (35) 3701-9560  
Universidade Federal de Alfenas  
[Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700](http://Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700)  
Centro - Alfenas, CEP 37130-001  
Minas Gerais, Brasil

**ANEXO A – Certificado do prêmio nacional de ensino de Bioquímica e Biologia Molecular**

