UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

IAGO DE ASSIS MODENEZ

Transferência de elétrons entre citocromo c e nanopartículas de óxidos de ferro como biomimético da cadeia respiratória

SÃO CARLOS – SP
2020

Iago de Assis Modenez

Transferência de elétrons entre citocromo c e nanopartículas de óxidos de ferro como biomimético da cadeia respiratória

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP) como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Exatas com ênfase em Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos – SP
2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial, aos meus pais Márcio e Leni, e minha irmã Isabele, pelo apoio e incentivo incessantes.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais Márcio e Leni que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e sendo suportes para o meu crescimento pessoal;
- A minha irmã Isabele que desde a infância sempre foi minha companheira;
- Ao meu orientador Frank Nelson Crespilho por me acompanhar nesta trajetória, não medindo esforços para me ajudar, encorajar e impulsionar a ser um pesquisador cada dia melhor. Muito Obrigado!
- A minha amiga Natália Mendes Sanches, por ter entrado e marcado minha vida de maneira tão intensa, obrigado por todas as palavras de incentivo. Engraçado como nossa conexão foi quase que imediata!
- Ao meu companheiro de laboratório Lucyano Jefferson Alves de Macedo, por me ajudar desde o começo do meu mestrado, tanto no âmbito intelectual quando na realização dos experimentos;
- Aos meus companheiros de laboratório José Guilherme e Giovana que, juntamente com a Natália, foram aqueles que durante este período, estiveram mais próximos de mim. Durante estes 2 anos, nós nos ajudamos mutuamente, o que tornou um período teoricamente estressante, mais leve;
- Aos meus companheiros do grupo Bioeletroquímica e Interfaces: Ayaz, Bruno, Daniel, Gabriel, Graziela, Isabela, João Carlos, José Eduardo, Luana, Thiago. Obrigado pelo apoio e as tardes regadas a muitas xícaras de café;
- Aos meus amigos da “Toca do Suricato”: Alef, Audrey, Juliana, Lucas, Natália, Thatielly, Uebert e Vinícius pelo companheirismo e os inúmeros churrascos;
- Aos meus amigos mais próximos Alef, Bruna, Eduardo, Érika, Juliana e Natália. Obrigado por sempre estarem comigo em todos os momentos, vocês são realmente uma

família para mim. Quando estou com vocês sinto que posso ser eu mesmo e essa é uma liberdade que não tem preço;

- Ao professor Dr. Osvaldo Novais Oliveira Junior do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) e a Dr^a. Andressa Ribeiro Pereira que colaboraram de forma direta para a realização deste trabalho, bem como, ao Dr. Antônio Francisco Arcanjo de Araújo Melo que também me auxiliou desde o início deste trabalho;
- Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) pela infraestrutura necessária para a realização deste trabalho;
- A Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) e seus técnicos pelo auxílio em análises e experimentos de caracterização dos materiais;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida (Processo nº 134396/2018-9);
- Aos professores Daniel Rodrigues Cardoso e Sérgio Antônio Spinola Machado pelas relevantes contribuições a este trabalho durante o exame de qualificação do mestrado;
- A todos os professores que já passaram e, de algum forma, marcaram minha vida. Obrigado por terem me dado o tesouro mais valioso: o conhecimento!

EPÍGRAFE

“Eu tenho medos bobos e coragens absurdas”

Clarice Lispector

RESUMO

A biologia sintética busca entender os processos biológicos no nível molecular e desenvolver materiais bioinspirados, com propriedades semelhantes ou aprimoradas em relação aos organismos vivos, capazes de mimetizar esses processos. Inúmeros materiais têm sido estudados e aplicados como miméticos de proteínas redox e, dentre eles, nanopartículas de óxidos de ferro têm se mostrado como potenciais candidatos na mimetização de processos envolvendo, principalmente, reações com transferência de elétrons. Neste estudo, propõe-se a mimetização de uma etapa redox da cadeia respiratória mitocondrial, empregando-se nanomateriais a base de óxidos de ferro e uma heme proteína, o citocromo c. Para tanto, nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) foram sintetizadas e a interação nanopartícula-proteína foi, inicialmente, estudada em solução e, posteriormente, em um modelo de membrana mitocondrial (filme de Langmuir-Blodgett). Experimentos *in situ* mostraram interações favorecidas por forças coulombianas e de van der Waals, resultando em uma transferência de elétrons direta entre os sítios de ferro superficiais das nanopartículas e o grupo heme da proteína, acarretando uma mudança no estado de oxidação deste grupo prostético, porém sem alterar significativamente ambas as estruturas secundária e terciária da proteína. Observou-se que as nanopartículas de Fe_3O_4 se comportam como miméticos redox do complexo III (citocromo bc_1) da cadeia respiratória, reduzindo o ferricitocromo c (Fe^{3+} -heme) à ferrocitocromo c (Fe^{2+} -heme) com uma constante heterogênea de transferência de elétrons, de segunda ordem, de $2,63 \pm 0,05 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C , e energia de ativação de $40,2 \pm 1,5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Já as nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ atuam como miméticos redox do complexo IV (citocromo c oxidase) da cadeia respiratória, reoxidando ferrocitocromo c à ferricitocromo c. Os resultados indicaram que a transferência de elétrons é dependente da proporção $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ superficiais nas nanopartículas, uma vez que, a redução do ferricitocromo c é controlada pelos íons Fe^{2+} , enquanto a oxidação do ferrocitocromo c, por sua vez, é dependente dos íons Fe^{3+} . Observou-se que quando incorporadas em um modelo de membrana mitocondrial, ambas as nanopartículas mantêm sua atividade redox frente ao citocromo c, indicando que sistemas inorgânicos nanoestruturados podem se comportar como complexos proteicos em um modelo de membrana celular.

Palavras-chave: biomimético, cadeia respiratória mitocondrial, citocromo c, nanopartículas, óxidos de ferro, modelo de membrana mitocondrial.

ABSTRACT

Synthetic biology pursues the understanding of biological processes in a molecular level, as well as, the design of bioinspired materials, with analogous or improved properties as compared to the living organisms, able to mimicry those processes. A number of materials have already been studied and applied as redox proteins mimetics and, among these, iron oxides nanoparticles have shown themselves as potential candidates in the mimicry of processes involving, mainly, electron transfer reactions. In this study, we propose the mimicry of an important redox step of the mitochondrial respiratory chain, applying iron oxides-based nanomaterials and a *heme* protein, the cytochrome c. For such, magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) and maghemite nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) were synthesized and the nanoparticle-protein interaction was, initially, proven in solution and, further, in a mitochondrial membrane model (Langmuir-Blodgett film). *In situ* experiments showed interactions highly favored by coulombic forces and van der Waals, resulting in a direct electron transfer between the superficial iron sites of the nanoparticles and the protein *heme* group, which by consequence changes the oxidation state of this prosthetic group, but not affecting the protein secondary and tertiary structures, though. We observed that the Fe_3O_4 nanoparticles behave as a complex III (cytochrome bc_1) redox mimetic, reducing the ferricytochrome c ($\text{Fe}^{3+}\text{-heme}$) to ferrouscytochrome c ($\text{Fe}^{2+}\text{-heme}$) with a second-order heterogeneous electron transfer rate constant of $2.63 \pm 0.05 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25°C , with an activation energy of $40.2 \pm 1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$. The $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles, on the other hand, act as a complex IV (cytochrome c oxidase) redox mimetic, re-oxidizing ferrouscytochrome c to ferricytochrome c. The results indicated that the extent of the reaction depends on the $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ratio on the surface of the nanoparticles, as superficial Fe^{2+} ions control the ferricytochrome c reduction, while ferrouscytochrome c oxidation depends on superficial Fe^{3+} ions. We also observed that, when incorporated in a mitochondrial cell membrane model, both nanoparticles maintain their redox activity towards cytochrome c, indicating that inorganic nanostructured systems may behave as protein complexes in a cellular membrane model.

Keywords: biomimetic, cytochrome c, iron oxide, nanoparticles, mitochondrial respiratory chain, mitochondrial model membrane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alguns dos mais relevantes grupos prostéticos responsáveis por processos de ET encontrados em metaloproteínas.....	22
Figura 2 – Representação da cadeia respiratória mitocondrial. Na cadeia transportadora de elétrons, estes são transportados ao longo da membrana mitocondrial por complexos proteicos a fim de gerar um gradiente eletroquímico de prótons que será força motriz para a síntese de ATP pela enzima ATP sintase.....	23
Figura 3 – Representação do transporte de elétrons pelo cit c entre os complexos III (aqui estão representadas as duas vias pelas quais os elétrons chegam ao cit c) e IV da cadeia respiratória.....	24
Figura 4 – Representação do cit c e do grupo prostético heme com destaque para os resíduos de metionina e histidina coordenados axialmente para fora do plano do anel porfirínico (os átomos de coordenação estão sinalizados em vermelho).....	25
Figura 5 – Estrutura cristalina e configuração eletrônica da (a) magnetita (Fe_3O_4) e (b) maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).....	27
Figura 6 – (a) Representação da estrutura de moléculas anfifílicas; (b) Formação de um filme de Langmuir; (c) Deposição e (d) tipos de filmes de Langmuir-Blodgett (LB).....	30
Figura 7 – Representação esquemática do material bioinspirado em uma das etapas redox da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. As nanopartículas de Fe_3O_4 (I) e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (II) foram incorporadas no modelo de membrana fosfolipídica e as reações de ET com o citocromo c (III) foi monitorada acompanhando-se o estado de oxidação do íon ferro (que alterna entre Fe^{3+} e Fe^{2+}) no grupo prostético heme (IV).....	31
Figura 8 – Representação do processo de preparo do filme de Langmuir-Blodgett com a incorporação das nanopartículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	41
Figura 9 – Formação de um filme de Langmuir durante os diferentes estágios de compressão.....	42
Figura 10 – Ilustração esquemática do feixe de infravermelho com polarização p e s incidindo com ângulo igual a θ sobre um filme fino de Langmuir-Blodgett.....	43
Figura 11 – (a) Representação do set-up experimental da microscopia no ângulo de Brewster; (b) Ilustração esquemática de um feixe de luz polarizada incidindo sobre um filme de Langmuir no ângulo de Brewster. Introduzindo-se um filme fino, as propriedades reflexivas do sistema são alteradas permitindo a composição de uma imagem morfológica; (c) Imagem morfológica da monocamada com destaque para os domínios lipídicos formados da ordem de 10 μm	44
Figura 12 – Ilustração dos eletrodos utilizados nos experimentos de eletroquímica, sendo eles: filme LB, filme LB + Cit c e filme NPs + LB + Cit c, conforme a figura.....	45
Figura 13 – Esquema ilustrativo do aparato instrumental empregado nos experimentos de espectroscopia de absorção eletrônica <i>in situ</i> na região do visível.....	46

Figura 14 - (a) e (b) Imagens de MET das Fe ₃ O ₄ -NPs sintetizadas; (c) Histograma e ajuste log-normal da distribuição de tamanho para as Fe ₃ O ₄ -NPs (10 nm); (d) Imagem de MET evidenciando os planos cristalinos (311) que se distam em 2,5 Å.....	48
Figura 15 – Difratoograma referente às Fe ₃ O ₄ -NPs sintetizadas (linha preta). Ficha cristalográfica COD 1011032 atribuída ao padrão de magnetita (linhas verticais em vermelho).....	48
Figura 16 - (a) Espectro de FTIR; (b) potencial zeta e (c) DLS das Fe ₃ O ₄ -NPs.....	49
Figura 17 - (a) Espectro de UV-vis do ferricitocromo c (●) e do ferrocitocromo c obtido após reação com as Fe ₃ O ₄ -NPs (●); (b) Região em escala expandida entre 500 nm e 600 nm.....	51
Figura 18 – Espectro UV-vis mostrando a diminuição na banda de transferência de carga Fe-S indicando a ruptura dessa ligação devido à redução do grupo heme ao longo do tempo (●) 0 min., (●) 2 min., (●) 4 min., (●) 6 min., (●) 20 min.; Esquema representativo da estrutura do grupo heme no ferricitocromo c e no ferrocitocromo c, respectivamente.....	52
Figura 19 - Espectros de dicroísmo circular do ferricitocromo c (●) e ferrocitocromo c (●) no (a) ultravioleta distante (260-200 nm), (b) no ultravioleta médio (320-260 nm) e (c) no ultravioleta próximo (440-380 nm).....	54
Figura 20 - Deconvolução da banda amida I para ambos (a) ferricitocromo c, (b) ferrocitocromo c e (c) citocromo c adsorvido ((●) α-hélice, (●) folhas-β e (●) voltas-β).....	54
Figura 21 – (a) Potencial zeta e (b) DLS das Fe ₃ O ₄ -NPs livres (●), do cit c livre (●) e do sistema Fe ₃ O ₄ -NPs -cit c (●); (c) Mapa de potencial eletrostático do citocromo c (visão frontal e posterior, respectivamente) indicando uma atração orientada entre o grupo heme e a superfície da nanopartícula, enquanto há, também, uma repulsão orientada entre a área posterior da proteína e a nanopartícula.....	56
Figure 22 – Decaimento exponencial da concentração de citocromo c em solução (concentração inicial de 10 μmol L ⁻¹) devido à fisissorção nas Fe ₃ O ₄ -NPs (432 μmol L ⁻¹).....	58
Figura 23 - Efeito da concentração de Fe ₃ O ₄ -NPs (●0, ●216, ●259, ●345, ●432, ●864 e ●1296 μmol L ⁻¹) na supressão da fluorescência do citocromo c em 15, 25 e 35 °C.....	59
Figura 24 - (a) Gráfico de Stern-Volmer para interação das Fe ₃ O ₄ -NPs com o cit c em diferentes temperaturas 15 °C (●), 25 °C (●) e 35 °C (●); (b) Intervalo linear das curvas de Stern-Volmer em diferentes temperaturas; (c) Relação entre log [(F ₀ - F)/F] com a concentração das nanopartículas log c Fe ₃ O ₄ para o cálculo de n e K _b	60
Figura 25 - (a) Formação de ferrocitocromo c ao longo do tempo; (b) Dependência do ln (A _∞ - A) com o tempo; (c) Dependência da constante de velocidade de pseudo primeira ordem com a concentração de Fe ₃ O ₄ -NPs; (As cores denotam a temperatura dos experimentos, sendo elas: 25 °C (●), 30 °C (●), 35 °C (●) e 40 °C (●); (d) Re-oxidação do ferrocitocromo c sob atmosfera inerte (●) e sob atmosfera saturada de O ₂ (●).....	62
Figura 26 - (a) Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação; (b) Gráfico de Eyring para o cálculo dos parâmetros de ativação.....	63
Figura 27 – Relação ln K _b e o inverso da temperatura absoluta para a determinação de ΔH° e ΔS°.....	64

- Figura 28** – Representação esquemática da reação de redução do ferricit c (I) pelas Fe_3O_4 -NPs (II), indicando as energias de $\Delta G^\ddagger$ e $\Delta G^\circ_{\text{interação}}$. A $\Delta G^\ddagger$ requer forças coulômbicas e de van der Waals entre as espécies, seguido da ET dos sítios de Fe^{2+} na superfície da NP para o grupo heme da proteína, resultando na formação de ferrocit c (III) e uma NP parcialmente oxidada (IV).....66
- Figura 29** - (a) e (b) Imagens de MET das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs sintetizadas; (c) Histograma e ajuste gaussiano da distribuição de tamanho para as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs (11 nm); (d) Imagem de MET evidenciando os planos cristalinos (311) e (400) que se distam em 2,5 Å e 2,1 Å, respectivamente.....67
- Figura 30** – Difratoograma referente às $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs sintetizadas (linha preta). Ficha cristalográfica COD 9006316 atribuída ao padrão de maghemita (linhas verticais em vermelho).....68
- Figura 31** - (a) Comparação da atividade redox das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e Fe_3O_4 na redução do ferricitocromo c; (b) Região da banda Q (500-600 nm) em 0 min. e 15 min. evidenciando que não houve alteração no estado de oxidação do grupo heme da proteína.....69
- Figura 32** – (a) Oxidação do ferrocitocromo c pelas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs ao longo do tempo. Os pontos isobésticos estão indicados por linhas rosas; (b) Deslocamento da banda Soret para comprimento de onda menores, indicando a oxidação do ferrocitocromo c; (c) Desaparecimento das bandas em 520 e 550 nm (que indicam um estado reduzido) e surgimento de uma única banda em 530 nm (indicando um estado oxidado); (d) Relação entre a absorbância normalizada das bandas em 530 nm e 550 nm com o tempo de reação.....70
- Figura 33** – Espectro UV-vis indicando um aumento na banda de transferência de carga referente a ligação Fe-S(Met) em 700 nm enquanto o ferricitocromo c é formado.....71
- Figura 34** – Esquema ilustrativo dos resultados obtidos da reação entre os óxidos de ferro nanoparticulados propostos e o citocromo c, ambos em solução.....72
- Figura 35** – Estrutura molecular dos fosfolipídios empregados na preparação do modelo de membrana mitocondrial.....73
- Figura 36** – (a) Isotermas de pressão superficial dos filmes de Langmuir de DPPC (●), DPPE (●), CL (●) e da mistura DPPC:DPPE:CL (●) em subfase de tampão PBS; (b) Isotermas de pressão superficial dos filmes de DPPC-DPPE-CL na ausência (●) e presenças das NPs (●) em subfase de tampão PBS.....74
- Figura 37** – Imagens de BAM do filme DPPC-DPPE-CL coletadas em subfase de tampão PBS na ausência de NPs (-) e na presença de uma mistura Fe_3O_4 -NPs/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs (+) em diferentes estágios de compressão da monocamada. Os *insets* mostram regiões selecionadas em escala expandida.....76
- Figura 38** – (a) Espectro de PM-IRRAS na região entre 1800 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} para os filmes DPPC-DPPE-CL (●) e DPPC-DPPE-CL-NPs (●); (b) Região entre 1800 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} ampliada; (c) e (d) Regiões isoladas entre 1800 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} para os filmes DPPC-DPPE-CL (●) e DPPC-DPPE-CL-NPs (●) para melhor visualização das bandas.....77
- Figura 39** – Espectro de PM-IRRAS da região entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} para os filmes DPPC-DPPE-CL (●) e DPPC-DPPE-CL-NPs (●).....78
- Figura 40** – Voltamogramas cíclicos para o filme DPPC-DPPE-CL (●), para o filme DPPC-DPPE-CL + Cit c (●) e para o filme DPPC-DPPE-CL-NPs + Cit c (●) obtidos em eletrodo de ITO sob atmosfera de argônio. (Velocidade de varredura: 5 mV; Eletrólito suporte: PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4; T = 25 °C).....80

Figura 41 – Filme de Langmuir-Blodgett DPPC-DPPE-CL-NPs sobre um suporte de vidro. Uma pequena região do filme foi isolada usando resina epóxi e, após secagem completa, uma solução de ferricitocromo c foi depositada sobre a região isolada entrando em contato com a membrana.....80

Figura 42 – (a) Espectro de absorção eletrônica *in situ* na região do visível do substrato de vidro (●), da membrana DPPC-DPPE-CL + Cit c em 0 min. (●) e 15 min. (●); O *insert* mostra a região da banda Q expandida para melhor visualização; (b) Espectro de absorção eletrônica *in situ* na região do visível da membrana DPPC-DPPE-CL-NPs + Cit c em 0 min. (●) e 15 min. (●); O *insert* mostra a região da banda Q expandida para melhor visualização.....81

Figura 43 – Representação esquemática do modelo de membrana mitocondrial bioinspirado com as Fe_3O_4 -NPs (I) e as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs (II) mimetizando os complexos III e IV da cadeia respiratória, respectivamente. O ferricitocromo c está representado em vermelho (III) enquanto o ferrocitocromo c está em rosa (IV).....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes e materiais utilizados nos experimentos.....	33
Tabela 2 - Equipamentos utilizados nos experimentos.....	34
Tabela 3 – Comparação das porcentagens das estruturas secundárias obtidas por CD e FTIR.....	55
Tabela 4 – Parâmetros de interação para Fe ₃ O ₄ -NPs-cit c em diferentes temperaturas.....	61
Tabela 5 – Parâmetros termodinâmicos de interação Fe ₃ O ₄ -NPs-cit c em diferentes temperaturas.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag/AgCl _{sat}	Eletrodo de prata-cloreto de prata em solução de cloreto de potássio saturada;
ATR	Refletância total atenuada;
Å ² /molécula	Área por molécula;
u.a.	Unidades arbitrárias;
BAM	Microscopia no ângulo de Brewster;
CD	Dicroísmo circular, do inglês <i>circular dichroism</i> ;
Cit c	Citocromo c;
CL	1,1',2,2'-tetramiristoil cardiolipina
Complexo III	Citocromo bc ₁ ;
Complexo IV	Citocromo c oxidase;
DLaTGS	Detector <i>Deuterated Lanthanum L-alanine doped Triglycine Sulphate</i> ;
DLS	Espalhamento dinâmico de luz, do inglês <i>dynamic light scattering</i> ;
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina;
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DRX	Difração de raios X;
ET	Transferência de elétrons, do inglês <i>electron-transfer</i> ;
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina;
Ferrocit c	Citocromo c em seu estado reduzido (Fe ²⁺);
Ferricit c	Citocromo c em seu estado oxidado (Fe ³⁺);
Fe ₃ O ₄ -NPs	Nanopartículas de magnetita;
FMN	Mononucleótido de flavina;
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier;
ITO	Eletrodo de óxido de estanho dopado com índio;
LB	Filme de Langmuir-Blodgett;
MET	Microscopia eletrônica de transmissão;
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina;
NADP	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina;
NPs	Nanopartículas;
SHE	Eletrodo padrão de hidrogênio, do inglês <i>standard hydrogen electrode</i> ;
pH	Potencial hidrogeniônico;
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i> ;

PM-IRRAS	Espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada;
UV-vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível;
VC	Voltametria cíclica
γ -Fe ₂ O ₃ -NPs	Nanopartículas de maghemita.

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Absorbância em um determinado tempo t ;
A_0	Absorbância no tempo 0;
A_∞	Absorbância no tempo final de reação;
$\text{\AA}$	Angstrom;
a	Parâmetro da rede cristalina;
B	Largura na meia altura do pico selecionado;
D	Tamanho médio de cristalito;
d	Distância interplanar;
d_h	Raio hidrodinâmico;
E°	Potencial padrão de redução;
E_a	Energia de ativação;
F_0	Intensidade de fluorescência na ausência de um agente supressor;
F	Intensidade de fluorescência na presença de um agente supressor;
nm	Nanômetro;
π	Pressão de superfície;
v	Velocidade de reação;
σ	Índice de polidispersividade;
ζ	Potencial zeta;
τ_0	Tempo de meia-vida do fluoróforo na ausência do agente supressor;
λ	Comprimento de onda da radiação;
θ	Ângulo de difração;
Ω	Ohm;
j	Densidade de corrente;
K	Fator de forma na equação de Scherrer;
k	Constante de velocidade de segunda ordem;
K_b	Constante de associação;
k_{obs}	Constante de velocidade aparente de pseudo primeira ordem;
K_q	Constante de supressão biomolecular;
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer;
n	Número de sítios de ligação por molécula de proteína;
Q	Agente supressor de fluorescência;
T	Temperatura;

t	Tempo;
ΔG°	Energia livre de Gibbs padrão;
ΔH°	Entalpia padrão;
ΔS°	Entropia padrão;
$\Delta H^\ddagger$	Entalpia de ativação;
$\Delta S^\ddagger$	Entropia de ativação;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Transferência de elétrons em meio biológico.....	21
2.2 A cadeia respiratória mitocondrial.....	22
2.3 O citocromo c.....	24
2.4 Nanopartículas de óxidos de ferro.....	26
2.5 Modelos de membrana celular e filmes de Langmuir-Blodgett.....	28
3 OBJETIVOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Materiais e Equipamentos.....	33
4.2 Síntese e caracterização das nanopartículas de Fe ₃ O ₄	34
4.3 Caracterização estrutural do citocromo c.....	35
4.4 Experimentos de adsorção.....	37
4.5 Experimentos de espectroscopia de fluorescência.....	37
4.6 Estudo cinético e termodinâmico.....	38
4.7 Síntese e caracterização das nanopartículas de γ -Fe ₂ O ₃	39
4.8 Preparação e caracterização dos filmes de Langmuir e de Langmuir-Blodgett (LB).....	40
4.9 Experimentos eletroquímicos.....	44
4.10 Espectroscopia de absorção eletrônica <i>in situ</i>	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de Fe ₃ O ₄	47
5.2 Transferência de elétrons entre nanopartículas de Fe ₃ O ₄ e ferricitocromo c.....	50
5.3 Mecanismo de interação entre nanopartículas de Fe ₃ O ₄ e ferricitocromo c.....	55
5.4 Estudo cinético e termodinâmico.....	61
5.5 Síntese e caracterização das nanopartículas de γ -Fe ₂ O ₃	66
5.6 Transferência de elétrons entre as nanopartículas de γ -Fe ₂ O ₃ e o ferrocitocromo c.....	68
5.7 Preparação e caracterização dos filmes de Langmuir-Blodgett.....	72
5.8 Transferência de elétrons <i>in situ</i> da membrana bioinspirada frente ao citocromo c.....	79
6 CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXO.....	94

1 INTRODUÇÃO

Processos que envolvem reações com transferência de elétrons (ET, do inglês *electron-transfer*) são essenciais na respiração celular e obtenção de energia pelos organismos vivos,¹ como é o caso da cadeia respiratória mitocondrial. Com intuito de não somente buscar um entendimento aprofundado desses processos mas também desenvolver novos materiais bioinspirados para uma ampla gama de aplicações, a biologia sintética tem sido usada como ferramenta ao longo dos anos,²⁻⁴ o que se reflete no número crescente de publicações e patentes nesta área do conhecimento científico.⁵ De forma geral, a biologia sintética visa a projeção e construção de novos sistemas biológicos, como enzimas, células, circuitos genéticos, entre outros. A modificação de sistemas já existentes com intuito de melhorá-los também é um alvo da biologia sintética.⁶ Diversos materiais como proteínas, lipídios, DNA/RNA, aminoácidos, entre outros, já foram utilizados para mimetizar processos biológicos, embora frequentemente se faça necessário complementar esses componentes naturais com materiais artificiais. Isto ocorre pois visa-se chegar o mais próximo possível dos processos naturais, principalmente, em termos de propriedades, ou até mesmo arquitetar sistemas inexistentes na natureza.⁷

As reações de ET que envolvem o citocromo c (cit c), uma proteína elétron-transportadora, constituem uma das etapas fundamentais da cadeia respiratória. Nesta etapa o cit c passa por uma reação de redução (pelo complexo III) e, em seguida, é oxidado pelo complexo IV, ambos os complexos incorporados na membrana lipídica celular. Como reações de ET com óxidos de ferro nanoparticulados já foram reportadas,⁸ este material é um candidato em potencial para mimetizar as propriedades redox desses complexos proteicos frente ao cit c. A elucidação do mecanismo de ET, em escala molecular, se mostra importante para descrever as interações químicas na interface proteína-nanopartícula, além de contribuir para o desenvolvimento de novos materiais biomiméticos que poderão, no futuro, ser aplicados como biosensores, materiais para obtenção de energia e catalisadores para síntese de moléculas com alto valor agregado, por exemplo.

Neste contexto, esta Dissertação de Mestrado trata do desenvolvimento de um sistema bioinspirado em uma das etapas da cadeia respiratória mitocondrial, bem como, da investigação mecanística quanto a ET entre nanopartículas e o citocromo c. As nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) foram sintetizadas e caracterizadas por técnicas de microscopia, difração de raios-X e espectroscópicas. A ET, bem como, o mecanismo de interação nanopartícula-proteína, foram estudados em solução utilizando-se técnicas de espectroscopia UV-vis, dicróismo circular (CD), espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier

(FTIR), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta e espectroscopia de fluorescência. Além disso, parâmetros cinéticos e termodinâmicos foram determinados experimentalmente, acompanhando-se a reação de redução do citocromo c por espectroscopia UV-vis *in situ*, e aplicando-se as equações matemáticas apropriadas. Destaca-se ainda a incorporação das nanopartículas em um modelo de membrana mitocondrial (filme de Langmuir-Blodgett) formado por 3 classes de moléculas fosfolipídicas e caracterizado utilizando isotermas de pressão superficial, espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) e microscopia no ângulo de Brewster (BAM). Os resultados obtidos indicaram que sistemas inorgânicos nanoestruturados podem se comportar como complexos proteicos em um modelo de membrana celular, abrindo caminho para o desenvolvimento de materiais miméticos mais sofisticados e robustos de proteínas de membrana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Transferência de elétrons em meio biológico

A transferência e transporte de elétrons em meios biológicos é uma das etapas primordiais na obtenção, armazenamento e utilização de energia, mantendo em funcionamento praticamente todas as atividades celulares.⁹ Os dois exemplos mais importantes e bem estabelecidos envolvendo ET na biologia são as reações catalisadas pelos complexos proteicos redox nas células fotossintéticas (armazenando energia solar na forma química da glicose)¹⁰ e a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (possibilitando a síntese de adenosina trifosfato (ATP) que será utilizado pelos organismos vivos para obtenção de energia química).¹¹ Vale ressaltar que reações de ET em meio biológico não estão restringidas somente a processos intracelulares, uma vez que certos microrganismos – especialmente, as bactérias – possuem mecanismos de “respiração extracelular” em condições anaeróbicas, que acopla a oxidação de matéria orgânica intracelular com a ET para o meio extracelular (em geral, ocasionando a redução de óxidos metálicos).¹²

As metaloproteínas são aquelas que contém um ou mais íons metálicos em sua estrutura atuando como cofatores diretamente responsáveis pelos processos de ET.¹³ Todavia, sabe-se que o microambiente proteico que envolve esses cofatores exerce influência significativa sobre as propriedades eletroquímicas dos mesmos,¹⁴ de forma que ambos se tornam interdependentes. Os grupos prostéticos (componentes de natureza não-proteica conjugados à proteína/enzima que são essenciais para sua atividade biológica) mais comumente encontrados em proteínas envolvidas em processos de ET estão representados na Figura 1, onde observa-se presença significativa de íons cobre (que podem ser classificados como do tipo *blue copper* ou Cu_A) e ferro (geralmente, grupos heme ou Fe-S) como centros metálicos.¹⁵

Mimetizar processos biológicos que envolvam metaloproteínas tem sido foco de diversos estudos ao longo dos anos,^{16–18} especialmente, pois necessita-se primeiramente entendê-los de forma aprofundada para, então, propor mecanismos moleculares envolvidos nesses processos, bem como desenvolver materiais com propriedades similares para aplicações, tanto no campo científico quanto, no tecnológico.

Figura 1 – Alguns dos mais relevantes grupos prostéticos responsáveis por processos de ET encontrados em metaloproteínas.

Fonte: Adaptado de RAANAN, H.; PIKE, D. H.; MOORE, E. K.; FALKOWSKI, P. G.; NANDA, V.; *PNAS*, 115 (6), p. 1281, 2018 ¹⁹ (Copyright by CC BY-NC-ND 4.0) e SOLOMON, E. I.; XIE, X.; DEY, A.; *Chem. Soc. Rev.* 37, p. 624, 2008 ¹⁵ com permissão da Royal Society of Chemistry.

2.2 A cadeia respiratória mitocondrial

A fosforilação oxidativa é a etapa final do metabolismo produtor de energia em organismos aeróbios e, em eucariotos (organismos com células organizadas em estruturas complexas por membranas internas e citoesqueleto), ocorre nas mitocôndrias. De forma generalista, a fosforilação oxidativa pode ser dividida em duas partes: a cadeia transportadora de elétrons (ou cadeia respiratória) e a síntese de ATP (caracterizada por enzimas da classe das ATP sintases). O processo inicia-se com a entrada de elétrons na cadeia transportadora, estes elétrons resultam da ação de enzimas desidrogenases que os coletam das vias catabólicas e os “canalizam” para os aceptores universais de elétrons NAD e FAD. Em seguida, esses elétrons passam por uma série de complexos proteicos elétron-transportadores que agem sequencialmente, os aceitando e doando através de seus grupos prostéticos (Figura 2). O transporte de elétrons pela membrana mitocondrial é facilitado por pequenas proteínas redox solúveis que não estão fixadas na membrana, como é o caso do citocromo c.²⁰ Os carregadores são organizados em complexos supramoleculares inseridos dentro da membrana com ordem crescente de potenciais de redução (E°) (reações em cascata), visto que os elétrons fluem espontaneamente de carregados com menores E° para maiores E° , sendo este processo altamente exergônico e termodinamicamente estável, com um ΔE° de 1,14 V, resultando em uma energia livre padrão ΔG° de -220 kJ mol^{-1} .²¹

Figura 2 – Representação da cadeia respiratória mitocondrial. Na cadeia transportadora de elétrons, estes são transportados ao longo da membrana mitocondrial por complexos proteicos a fim de gerar um gradiente eletroquímico de prótons que será força motriz para a síntese de ATP pela enzima ATP sintase.

Fonte: BC Open Textbook Project com permissão concedida sob a licença CC BY 4.0. Disponível em <<https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/24-2-carbohydrate-metabolism/>>

De forma resumida, os complexos I e II catalisam a ET para a molécula de ubiquinona (Q) convertendo-a para ubiquinol (QH₂). O ubiquinol – uma molécula apolar – transporta-se pela membrana lipídica até o complexo III, onde é oxidado, retornando novamente à ubiquinona. O complexo III, por sua vez, transfere elétrons para o cit c, que migra através da membrana até o complexo IV, que catalisa a ET do citocromo para o O₂ produzindo H₂O.

O complexo III (também conhecido como citocromo bc₁) é um dímero, com duas unidades monoméricas de citocromo b. Ao todo, este complexo transfere 2 elétrons para o cit c por vias diferentes: um elétron é transferido do QH₂ para um centro Fe-S que, em seguida, é transferido para o citocromo c₁ e, por fim, chega ao cit c; o outro elétron passa por um grupo heme b_L, em seguida para um heme b_H e, por fim, é recebido por uma molécula de Q convertendo-a em um radical semi-quinona (Q•); este processo ocorre duas vezes gerando, ao todo, uma molécula de Q e duas moléculas de cit c reduzidas.²² Já o complexo IV (conhecido como citocromo c oxidase) é composto por um centro de cobre binuclear (Cu_A e Cu_B) e por dois grupos heme (heme a e heme a₃). A ET acontece do cit c reduzido para o centro Cu_A, em seguida para o heme a, para o centro heme a₃-Cu_B e, finalmente, para o O₂. A cada 4 elétrons que passam pelo complexo, o citocromo c oxidase precisa de 4 prótons da matriz (lado N) que

são utilizados na redução de oxigênio à H_2O (Figura 3).²³ A interação entre o cit c e os complexos III e IV se dá, primeiramente, por atrações eletrostáticas de longo alcance com orientação bem definida, seguido de interações de van der Waals que possibilitam velocidades de ET maiores que 100/s.²⁴

Figura 3 – Representação do transporte de elétrons pelo cit c entre os complexos III (aqui estão representadas as duas vias pelas quais os elétrons chegam ao cit c) e IV da cadeia respiratória.

Fonte: Autoria própria. PDB complexo III (1BGY), citocromo c (2B4Z) e complexo IV (5Z62).

Os complexos I, III e IV da cadeia respiratória acopla o transporte de elétrons com o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico de prótons que fornece a energia potencial necessária para a condensação de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (P_i) formando ATP pela enzima ATP sintase, que posteriormente será usado como fonte energética pelo organismo.²⁵

2.3 O citocromo c

O citocromo c é uma proteína redox solúvel em água que possui um grupo prostético heme (grupo ferro porfirinas), com função elétron-transportadora presente entre as membranas interna e externa na cadeia respiratória mitocondrial.²⁶ É classificada como uma proteína periférica de membrana (ou seja, está apenas temporariamente associado à membrana celular, podendo esta associação ser perdida alterando-se propriedades do meio biológico), apresenta formato globular e é constituída de uma única cadeia polipeptídica com um diâmetro de

aproximadamente 34 Å e, no caso de mamíferos, pode apresentar até 104 resíduos de aminoácidos com massa aproximada de 12 kDa.²⁷ Em termos estruturais, o cit c é uma proteína relativamente simples. Porém, dependendo de sua origem, quantidade de grupos prostéticos e tamanho da cadeia polipeptídica, algumas propriedades podem variar. Sua estrutura secundária é, na maior parte dos casos, majoritariamente composta de α -hélices (cerca de 54%), seguida de folhas- β (cerca de 20%) e voltas- β (cerca de 16%).²⁸ Devido ao alto conteúdo de resíduos de lisina (Lis), histidina (His) e arginina (Arg) – que se encontram posicionados de forma adjacente ao grupo heme – esta é classificada como uma proteína básica em pH fisiológico com ponto isoelétrico em pH 10.²⁹ Sua propriedade elétron-transportadora é possível devido à presença de um único grupo prostético (ligado covalentemente à proteína por meio de ligações tioéter com dois resíduos de cisteína (Cis) nas posições 14 e 17) constituído de quatro anéis pirrólicos, ligados entre si por ligações metilênicas, formando uma estrutura porfirínica com seus átomos de nitrogênio coordenados com um íon ferro central que pode apresentar estados de oxidação Fe^{2+} ou Fe^{3+} (Figura 4). Em sua forma reduzida (Fe^{2+}) o cit c recebe como nomenclatura ferrocitocromo c, enquanto, em sua forma oxidada (Fe^{3+}), este é conhecido como ferricitocromo c. O grupo prostético possui geometria octaédrica e o átomo de ferro se encontra hexacoordenado sendo o quinto e o sexto ligantes resultantes de ligações covalente axiais para fora do plano com um átomo de enxofre de um resíduo de metionina (Met) e um átomo de nitrogênio de uma histidina (His) nas posições Met(80) e His(18), sendo ambos os ligantes de campo forte que mantêm a estrutura eletrônica spin-baixo do centro metálico de ferro.²⁶

Figura 4 – Representação do cit c e do grupo prostético heme com destaque para os resíduos de metionina e histidina coordenados axialmente para fora do plano do anel porfirínico (os átomos de coordenação estão sinalizados em vermelho).

Fonte: Autoria própria. PDB citocromo c (2B4Z).

Um detalhe importante na estrutura do cit c é que a extremidade do anel porfirínico está localizada na superfície da molécula (ocupando cerca de 3% da área superficial total), o que fornece indicações sobre a dependência de reatividade deste grupo em relação à fatores estéricos e orientação espacial bem definida. Alguns estudos^{30,31} propõem que com a redução do centro de ferro, ocorra uma ruptura da ligação axial deste com o resíduo de metionina (Fe-S), que acarretaria em uma pequena abertura da região do grupo heme devido à movimentação de um domínio da sequência de resíduos de aminoácidos nas posições 73 a 80.

As proteínas citocromos do tipo c estão envolvidas em diversos processos de ET no meio biológico, tanto em condições aeróbicas quanto em anaeróbicas, já que são capazes de transferir elétrons de maneira rápida e eficiente. Isto ocorre pois os orbitais π t_{2g} ricos em elétrons do átomo de Fe (t_{2g}^5 para Fe^{3+} e t_{2g}^6 para Fe^{2+}) se sobrepõem com os orbitais π^* do anel porfirínico, o que “estende” o orbital π do Fe até a extremidade do anel, requerendo, portanto, uma distância menor para a ET entre dois pares redox.³² No caso particular da respiração aeróbica, a função do cit c é transportar elétrons entre os complexos III (citocromo bc_1) e complexo IV (citocromo oxidase) na cadeia respiratória.²⁰ O cit c associa-se com a superfície externa da membrana interna por meio de interações eletrostáticas que são fundamentais na orientação espacial da proteína para a ET. O potencial padrão de redução do centro de ferro do grupo heme depende de sua interação com as cadeias laterais da proteína e seu valor é próximo de 0,254 V (*vs* SHE (eletrodo padrão de hidrogênio)).

2.4 Nanopartículas de óxidos de ferro

Óxidos de ferro nanoparticulados são materiais altamente promissores para aplicação na biologia sintética devido à sua abundância no meio ambiente e por possuírem atividade redox, principalmente no metabolismo celular de microrganismos.³³ As duas fases de óxidos de ferro isoestruturais mais estudadas e comuns são a magnetita e a maghemita e, ambas têm sido amplamente aplicadas devido às suas propriedades superparamagnéticas.³⁴

A magnetita (Fe_3O_4) é formada por íons Fe^{3+} e Fe^{2+} em uma proporção estequiométrica 2:1 dispostos em uma estrutura conhecida como espinélio inverso com íons O^{2-} em uma estrutura cúbica de face centrada (FCC, do inglês *face-centered cubic*), 8 sítios tetraédricos e 16 sítios octaédricos ocupados por íons de ferro. Devido à energia de estabilização do campo cristalino, os íons Fe^{2+} ocupam preferencialmente os sítios octaédricos, enquanto os íons Fe^{3+} são igualmente divididos entre os sítios octaédricos e tetraédricos. Assim, a célula unitária de uma nanopartícula de magnetita contém 8 íons metálicos ocupando sítios tetraédricos, 16 sítios

octaédricos e 32 ânions de oxigênio, podendo ser representada por $[\text{Fe}^{3+}]^{\text{tetr}}_8[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]^{\text{oct}}_{16}\text{O}_{32}$.³⁵ No estado fundamental, os íons Fe^{3+} possuem cinco elétrons não-emparelhados nos orbitais d, enquanto os íons Fe^{2+} têm dois elétrons emparelhados e quatro não-emparelhados (Figura 5a). No diagrama de distribuição eletrônica da Figura 5a, destaca-se o elétron que alterna entre dois sítios octaédricos (colorido em vermelho) devido a um fenômeno conhecido como interação de super troca e, enquanto os íons Fe^{3+} (nos sítios octaédricos e tetraédricos) estão acoplados antiferromagneticamente, os elétrons dos íons Fe^{2+} nos sítios octaédricos geram um momento magnético à estrutura cristalina que é responsável pelas propriedades superparamagnéticas das Fe_3O_4 -NPs.

Por outro lado, a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), apesar de apresentar a mesma estrutura cristalina que a magnetita, caracteriza-se por vacâncias de íons Fe^{2+} em sua estrutura, sendo assim, em uma única célula unitária ambos os sítios tetraédricos e octaédricos são ocupados por íons Fe^{3+} , sendo representada como $[\text{Fe}^{3+}]^{\text{tetr}}_8[\text{Fe}^{3+}_{5/6}\square_{1/6}]^{\text{oct}}_{16}\text{O}_{32}$.³⁶ Apesar de a maghemita apresentar propriedades magnéticas, estas são muito menos pronunciadas em comparação à magnetita, devido à presença dessas vacâncias, fazendo com que os spins dos elétrons da estrutura cristalina se cancelem (Figura 5b).

Figura 5 – Estrutura cristalina e configuração eletrônica da (a) magnetita (Fe_3O_4) e (b) maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Fonte: Adaptado de PHAN, M-H.; *et al.* Exchange bias effects in iron oxide-based nanoparticles systems. **Nanomaterials**, v. 6, n. 11, 221, 2016. Copyright by CC BY 4.0.

As nanopartículas de óxidos de ferro têm sido utilizadas para uma vasta gama de aplicações biomédicas e tecnológicas, tais como liberação controlada de fármacos,³⁷ catálise,³⁸ imobilização de enzimas,³⁹ biossensores,⁴⁰ separação e purificação de biomoléculas e células,⁴¹ etc.^{42,43} O trabalho publicado por Gao *et al.* em 2007,⁴⁴ originou inúmeras pesquisas envolvendo nanopartículas de Fe₃O₄ como “*nanozymes*” – materiais que mimetizam a atividade peroxidase de enzimas – capazes de catalisar reações de oxidação de modo similar ao de enzimas contendo grupos prostéticos heme. A ET envolvendo nanopartículas de magnetita/maghemita e proteínas já foi reportado na literatura⁴⁵ e alguns trabalhos prévios^{46,47} também indicaram a presença de óxidos de ferro nanoparticulados como mediadores redox no metabolismo de microrganismos. A ET nesses sistemas microbiais ocorre na interface da membrana celular e os óxidos de ferro, e somente é possível devido a existência de proteínas citocromo do tipo c nessas células. Em 2010, Crespilho e colaboradores⁴⁸ propuseram a utilização de nanopartículas de magnetita estabilizadas com cloreto de polidialildimetilamônio (PDAC) como material biomimético para a redução de H₂O₂ em células a combustível. Neste caso, a presença de íons Fe³⁺ nas nanopartículas é responsável pela alta atividade eletrocatalítica frente ao peróxido, catalisando a reação de maneira similar a um grupo prostético enzimático. Tendo em vista esses resultados já reportados, é plausível propor um sistema baseado nessas propriedades de ET com intuito de estudar a aplicação desses óxidos de ferro como biomiméticos redox dos complexos III e IV da cadeia respiratória frente ao cit c.

2.5 Modelos de membrana celular e filmes de Langmuir-Blodgett

Membranas biológicas, também denominadas biomembranas, são constituintes estruturais e funcionais de elevada importância na manutenção das funções celulares.⁴⁹ Em células animais, os principais constituintes das biomembranas são os lipídios pertencentes predominantemente à classe dos fosfolipídios, formados por três grupos de moléculas menores: um álcool (em geral, glicerol), duas moléculas de ácidos graxos e um grupo fosfato, que dão origem a uma molécula longa com uma extremidade hidrofílica e cadeia hidrofóbica, caracterizando os fosfolipídios como moléculas anfifílicas (Figura 6a).⁵⁰ No caso da membrana mitocondrial, 90% de sua composição é de fosfolipídios que se encontram no estado líquido-cristalino organizados em bicamada com espessura variando entre 5 e 10 nm.⁵¹

Devido à complexidade das membranas celulares, modelos de membranas formadas por apenas poucos componentes de interesse, têm sido usados para a simulação e estudo das

propriedades físico-químicas desses sistemas. Dentre os principais modelos empregados estão as monocamadas de Langmuir e os filmes de Langmuir-Blodgett.

As monocamadas de Langmuir (Figura 6b) são filmes de espessura monomolecular insolúveis em água que se formam na interface gás-líquido, em geral, originados por moléculas anfifílicas.⁵² Para formar um filme de Langmuir constituído de fosfolipídios, dissolve-se uma pequena quantidade desse material em um solvente insolúvel em água (com baixa constante dielétrica) e volátil, em seguida, esta solução é espalhada sobre a superfície limpa de uma subfase líquida (geralmente, água ultra-pura) contido em uma cuba de Langmuir. Dessa forma, as moléculas fosfolipídicas se orientam na superfície do líquido de modo que o grupo polar fique imerso na água enquanto a longa cadeia apolar aponte para o ar.⁵³ Acoplada à esta cuba – que é constituída de um material inerte,⁵⁴ por exemplo, Teflon – estão duas barreiras móveis que aumentam ou diminuem a área ocupada pelo filme.

Os filmes de Langmuir são modelos que reproduzem apenas metade de uma membrana celular – que, como dito anteriormente, é composta por uma bicamada lipídica – não sendo possível realizar estudos compreendendo eventos transmembranares. Entretanto, este modelo apresenta algumas vantagens sendo as principais: o controle da densidade e composição lipídica da membrana, experimentos realizados em meio aquoso, controle de algumas propriedades físico-químicas do filme e do meio (como pressão superficial, temperatura, pH e área por molécula disponível).⁵⁵ Os filmes formados podem ser caracterizados por isotermas de pressão superficial e potencial de superfície, microscopia no ângulo de Brewster, espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada, entre outros.

Os filmes de Langmuir, quando no estado condensado (moléculas dispostas em um arranjo ordenado), podem ser transferidos para suportes sólidos formando os chamados filmes de Langmuir-Blodgett (LB).⁵⁶ Este processo é realizado a partir da imersão e/ou emersão vertical do suporte sólido, de forma a depositar uma camada em cada lado do suporte, como mostrado na Figura 6c. A repetição deste processo pode dar origem a filmes com diferentes números de camadas. Um parâmetro importante para o controle da qualidade do filme depositado é a taxa de transferência (TR), definida pela relação entre a área de filme removido da interface gás-líquido e área recoberta do substrato, que idealmente deve aproximar-se de 1,0. Podem ser obtidos três tipos de filmes LB, de acordo com a forma de deposição, sendo eles: do tipo X, Y ou Z,⁵⁷ conforme ilustrado na Figura 6d.

Figura 6 – (a) Representação da estrutura de moléculas anfifílicas; (b) Formação de um filme de Langmuir; (c) Deposição e (d) tipos de filmes de Langmuir-Blodgett (LB).

Fonte: Autoria própria.

O tipo X implica na deposição de camadas somente nas imersões do suporte na subfase, já o tipo Y implica na deposição durante os processos de imersão e emersão na subfase, por fim, no tipo Z as camadas são depositadas somente nas emersões do substrato. Os filmes do tipo Y são mais comuns devido à sua maior estabilidade em relação aos demais, uma vez que, neste caso, grupos de mesma afinidade estão em contato em interação do tipo cabeça-cabeça e cauda-cauda. Os filmes LB são vantajosos devido a maior abrangência no números de técnicas de caracterização para determinação de suas propriedades físico-químicas, além da maior possibilidade em utilizá-los na construção de dispositivos com aplicação em óptica, fotônica, biossensores, entre outros.⁵⁸

Neste projeto, os filmes de Langmuir-Blodgett foram escolhidos para a mimetização da membrana mitocondrial devido a sua simplicidade, estabilidade e a possibilidade de se estabelecer uma correspondência direta em termos de estrutura destes com uma membrana celular real, como já apontado por alguns autores na literatura.⁵⁹⁻⁶¹ Os materiais nanoparticulados de óxidos de ferro sintetizados foram incorporados nesses filmes LB e a atividade redox desses sistema bioinspirado foi estudada frente ao citocromo c. A Figura 7 ilustra de forma resumida o sistema proposto.

Figura 7 – Representação esquemática do material bioinspirado em uma das etapas redox da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. As nanopartículas de Fe_3O_4 (I) e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (II) foram incorporadas no modelo de membrana fosfolipídica e as reações de ET com o citocromo c (III) foi monitorada acompanhando-se o estado de oxidação do íon ferro (que alterna entre Fe^{3+} e Fe^{2+}) no grupo prostético heme (IV).

Fonte: Autoria própria. PDB citocromo c (2B4Z).

3 OBJETIVOS

Este estudo visa o desenvolvimento de um sistema bioinspirado em uma das etapas da cadeia respiratória mitocondrial, baseando-se na transferência de elétrons direta entre nanopartículas de óxidos de ferro e o citocromo c, com intuito de elucidar este mecanismo de transferência em escala molecular, bem como contribuir para o desenvolvimento de novos materiais biomiméticos de complexos proteicos incorporados em modelos de membrana celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e Equipamentos

As vidrarias e materiais utilizados foram previamente limpos a fim de evitar possíveis contaminações nos experimentos. As soluções foram preparadas em água ultrapura com resistividade de 18,2 MΩ cm. Os reagentes e materiais utilizados estão listados na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1 - Reagentes e materiais utilizados nos experimentos.

Reagente/Material	Procedência
Citocromo c de coração bovino (CAS No. 9007-43-6, 95%)	Sigma-Aldrich®
Cloreto férrico hexaidratado (FeCl ₃ ·6H ₂ O, 99%)	Sigma-Aldrich®
Cloreto ferroso tetraidratado (FeCl ₂ ·4H ₂ O, 99%)	Sigma-Aldrich®
Ácido clorídrico (HCl, 37%)	Sigma-Aldrich®
Solução de Nafion® 5 % (v/v)	Sigma-Aldrich®
Sephadex® G-75 superfine	Sigma-Aldrich®
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina	Sigma-Aldrich®
Eletrodo de óxido de estanho dopado com índio	Sigma-Aldrich®
Hidróxido de sódio (NaOH, 98%)	Synth®
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ , 98%)	Synth®
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄ , 98%)	Synth®
Cloreto de potássio (KCl, 99%)	Synth®
Cloreto de sódio (NaCl, 99%)	Synth®
Grade de cobre com filme de carbono (400 mesh)	EMS®
1,1',2,2'-tetramiristoil cardiolipina	Avanti Polar Lipids®
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	Avanti Polar Lipids®
Clorofórmio grau HPLC	Panreac®

Fonte: Autoria própria.

Os equipamentos utilizados nos experimentos estão listados na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2 - Equipamentos utilizados nos experimentos.

Equipamento	Fabricante
Microscópio eletrônico de transmissão	JEOL [®]
Difratômetro D8 Advanced	Bruker [®]
Espectrofotômetro Vertex 70v	Bruker [®]
Zetasizer Nano Series	Malvern [®]
Espectrofotômetro V-760	Jasco [®]
Espectropolarímetro J-815	Jasco [®]
Espectrofluorímetro F-4500	Hitachi [®]
Potenciostato Autolab PGSTAT204	Metrohm [®]
AvaSpec-2048	Avantes [®]
Mini KSV Langmuir	KSV Instruments [®]
Microseringa Pipette	Hamilton Company [®]
PM-IRRAS KSV PMI 550	KSV Instruments [®]
EP4 imaging elipsômetro	Accurion [®]

Fonte: Autoria própria.

As estruturas proteicas representadas nas figuras desta dissertação, bem como o mapa de potencial eletrostático, foram feitas com auxílio do software de domínio público UCSF Chimera.⁶² Os códigos de identificação PDB (*Protein Data Bank*) utilizados estão indicados na fonte das respectivas figuras.

Os espectros obtidos foram corrigidos, quando necessário, em relação à linha de base e redução de ruído no software Origin[®].

4.2 Síntese e caracterização das nanopartículas de Fe₃O₄

Nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄-NPs) do tipo *bare* (ou seja, sem a presença de camadas de recobrimento) foram sintetizadas seguindo o método da coprecipitação.⁶³ Para tanto, FeCl₃·6H₂O (5,4 g) e FeCl₂·4H₂O (2,0 g) foram dissolvidos em 25 mL de uma solução de aerada 10 mmol L⁻¹ de HCl. Sob uma atmosfera de N₂ saturada, 250 mL de uma solução de aerada 1,5 mol L⁻¹ de NaOH foram adicionados lentamente à mistura de Fe³⁺/Fe²⁺ a 80 °C. A reação foi vigorosamente agitada durante 30 minutos, gerando as nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄-NPs). As Fe₃O₄-NPs foram, então, separadas magneticamente da solução e lavadas repetidamente com água deionizada até que se atingisse pH neutro. Por fim, uma solução

estoque (5 mg mL⁻¹) foi preparada dispersando as Fe₃O₄-NPs em uma solução de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) 5 mmol L⁻¹ pH 7,4.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas em um microscópio JEOL JEM-2100 operando a 200 kV, com intuito de se obter informações a respeito de tamanho e morfologia das nanopartículas sintetizadas. A amostra foi preparada gotejando-se uma suspensão diluída das nanopartículas em uma grade de cobre 400 mesh recoberta com um filme de carbono que, posteriormente, foi seca sob vácuo. O tamanho médio e o índice de polidispersividade foram determinados (baseados na contagem de 150 nanopartículas) utilizando o software de domínio público Image J. Os difratogramas foram coletados em um difratômetro Bruker D8 Advanced, empregando uma radiação de cobre ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e com variação do ângulo de varredura em um intervalo de $25^\circ < 2\theta < 100^\circ$, com passos de $0,02^\circ$ medidos a cada 10 segundos. O tamanho médio de partícula foi calculado com base nos três picos de difração mais intensos (311), (511) e (440), através da equação de Scherrer (Equação 1):

$$D = K\lambda / (B \cos \theta) \quad (1)$$

onde K é o fator de forma (aproximadamente 0,9 para partículas esféricas), λ é o comprimento de onda da radiação, B é a largura na meia altura do pico selecionado e θ é o ângulo de difração.⁶⁴ Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em um espectrômetro Bruker Vertex 70v no modo de transmissão utilizando pastilha de KBr (preparada a partir de 1 mg de nanopartículas e 99 mg de KBr) na região de 4000-450 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos a partir de 32 acumulações com resolução de 4 cm⁻¹, empregando um detector DLaTGS (*Deuterated Lanthanum L-alanine dopped Triglycine Sulphate*). Experimentos de potencial zeta (ζ) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizados em um Zetasizer Nano Series ZS a 25 °C, com fonte de luz He-Ne laser 633 nm. Uma suspensão de Fe₃O₄-NPs com concentração de 0,1 mg mL⁻¹ foi preparada em solução tampão PBS 5 mmol L⁻¹ pH 7,4 e, em seguida, filtrada em membrana com poros da ordem de 0,2 μm com intuito de remover qualquer impureza remanescente que pudesse comprometer os resultados. Os resultados apresentados são a média de 3 acumulações.

4.3 Caracterização estrutural do citocromo c

Inicialmente, o citocromo c foi purificado utilizando-se uma coluna cromatográfica com matriz de Sephadex G-75 superfine (faixa de fracionamento 3000 – 70 000 Da) e solução

PBS 5 mmol L⁻¹ pH 7,4 como eluente. Todas as soluções proteicas utilizadas foram preparadas em solução tampão PBS 5 mmol L⁻¹ pH 7,4. Os espectros de absorção no ultravioleta/visível (UV-vis) foram coletados em um espectrofotômetro Jasco V-760 na região de 200-750 nm, empregando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm e uma solução de cit c 81 µmol L⁻¹. Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco J-815 no intervalo de 200-500 nm, com 10 acumulações a 25 °C empregando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. As amostras foram preparadas com concentrações de 10 µmol L⁻¹ e os espectros foram deconvoluídos usando o software de domínio público CDNN.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram coletados em um espectrômetro Bruker Vertex 70v no modo de refletância total atenuada (ATR) equipado com um cristal único de diamante e um detector DLaTGS. A amostra foi depositada (10 µL de uma solução de cit c com concentração 81 µmol L⁻¹) sobre o cristal de diamante e seca. Os espectros foram coletados na região de 3800-380 cm⁻¹, a partir de 32 acumulações com resolução de 4 cm⁻¹. A técnica de FTIR tem sido amplamente utilizada para quantificar os tipos de estruturas secundárias de proteínas.⁶⁵ Essas informações são majoritariamente obtidas a partir da análise da banda denominada amida I que ocorre entre 1700-1600 cm⁻¹ e é decorrente, em sua maior parte, dos estiramentos C=O dos grupamentos amida acoplados com os estiramentos das ligações C-N e com as torções das ligações N-H.⁶⁶ A atribuição das bandas é feita para a determinação dos diferentes tipos de estruturas secundárias segundo o que é descrito na literatura:²⁸ a região entre 1658-1650 cm⁻¹ (α -hélice), região entre 1642-1624 cm⁻¹ (folhas- β) e região entre 1690-1666 cm⁻¹ (voltas- β). Entretanto, esses componentes não são observados individualmente, e sim, sobrepostos gerando uma única banda no espectro de IR (a amida I). Assim, o processo de quantificação das estruturas envolve o uso de métodos matemáticos para o reconhecimento desses padrões, dentre eles, o método de deconvolução utilizando a segunda derivada que vem sendo empregado desde os anos 80,^{67,68} devido à sua simplicidade e acurácia. De forma generalista, o método consiste em tomar a segunda derivada da região correspondente à amida I com intuito de separar os picos que a compõem, em seguida, esses picos são simulados utilizando-se funções Gaussianas no espectro original e, a partir daí, correlaciona-se as áreas das gaussianas obtidas com as porcentagens relativas de cada uma das estruturas secundárias da proteína, sendo as atribuições realizadas conforme descrito anteriormente. O tratamento matemático formal para este processo pode ser encontrado no trabalho publicado por Cameron e Moffatt.⁶⁷

Os experimentos de potencial zeta (ζ) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizados em um Zetasizer Nano Series a 25 °C. Ambas as suspensões de Fe₃O₄-NPs e cit c

foram preparadas com concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e, em seguida, filtradas em membrana com poros da ordem de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ com intuito de remover qualquer impureza remanescente que pudesse comprometer os resultados. Para a análise do sistema Fe_3O_4 -NPs-cit c, as suspensões de ambos os materiais foram misturadas em proporção 1:1. Os valores apresentados são a média de 3 acumulações. A carga residual da molécula de citocromo c foi calculada a partir de uma análise na sua sequência de aminoácidos feita pelo software ProtParam.

4.4 Experimentos de adsorção

Os experimentos de adsorção foram realizados para se determinar a distribuição de citocromo c livre em solução e adsorvido nas nanopartículas de Fe_3O_4 . A quantidade de proteína adsorvida foi determinada a partir da diminuição de sua absorbância na região do UV. Como o contato entre as Fe_3O_4 -NPs e o citocromo c resulta em processos de ET e adsorção, que ocorrem simultaneamente, foi necessário acompanhar a diminuição de proteína em solução a partir da banda de absorção dos resíduos aromáticos em 280 nm .⁶⁹ Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro Jasco V-760 na região de $200\text{-}700 \text{ nm}$, fixando-se a concentração de cit c ($10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS 5 mmol L^{-1} pH 7,4) e de Fe_3O_4 -NPs ($432 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$). A mistura foi mantida continuamente sob agitação e a concentração de proteína no sobrenadante (após a remoção das nanopartículas) foi monitorada ao longo do tempo.

4.5 Experimentos de espectroscopia de fluorescência

Experimentos de espectroscopia de fluorescência foram realizados com intuito de se estudar a interação entre o citocromo e as nanopartículas, já que estas atuam como agentes supressores da fluorescência. Os espectros de emissão foram coletados em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 (com uma cubeta de 1 cm de caminho ótico) em três temperaturas diferentes ($15, 25$ e $35 \text{ }^\circ\text{C}$). As fendas de excitação e emissão foram ajustadas para 5 nm e os espectros foram coletados na região entre $330\text{-}370 \text{ nm}$ com uma velocidade de escaneamento de 240 nm min^{-1} . A fluorescência foi determinada excitando uma solução de cit c $40 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ em 300 nm na presença de concentrações diferentes de Fe_3O_4 -NPs ($216, 259, 345, 432, 864$ e $1296 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$). Os espectros de referência foram obtidos com uma suspensão de Fe_3O_4 -NPs em tampão PBS e, já que estas não absorvem luz na região espectral sob estudo, o efeito intrínseco de emissão das nanopartículas não é significativo, não afetando assim as

análises de fluorescência. O mecanismo de supressão da fluorescência foi determinado utilizando a equação de Stern-Volmer⁷⁰ (Equação 2).

$$F_0 / F = 1 + K_{sv} cQ \quad (2)$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e presença do supressor Q , respectivamente, K_{sv} é a constante de Stern-Volmer e cQ é a concentração do agente supressor. A constante de supressão bimolecular foi calculada a partir da Equação 3.

$$K_{sv} = K_q \tau_0 \quad (3)$$

Onde K_q é a constante de supressão bimolecular e τ_0 é o tempo de meia-vida do fluoróforo na ausência do agente supressor (da ordem de 10^{-8} segundos)⁷¹. O número de sítios de ligação por molécula de proteína (n) e a constante de associação (K_b) foram calculados a partir da Equação 4.⁷⁰

$$\log ((F_0 - F)/F) = \log K_b + n \log cQ \quad (4)$$

4.6 Estudo cinético e termodinâmico

A reação de redução do ferricitocromo c foi estudada utilizando a técnica de espectroscopia UV-vis *in situ*. Os espectros foram coletados em um espectrofotômetro Jasco V-760, empregando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico. Com intuito de se determinar os parâmetros cinéticos de reação, as reações foram conduzidas em um regime de pseudo primeira ordem, onde as Fe_3O_4 -NPs estavam em excesso quando comparadas ao cit c. Os parâmetros foram avaliados fixando a concentração da proteína ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e variando a concentração das Fe_3O_4 -NPs (108, 216, 432 e $864 \mu\text{mol L}^{-1}$), sob diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 40°C). O equipamento foi programado para realizar uma aquisição de sinal em absorbância (A) a cada 10 segundos com um comprimento de onda fixo (550 nm), que caracteriza a formação de ferrocitocromo c. Considerando o excesso de Fe_3O_4 -NPs, é possível assumir que sua concentração ao longo do tempo é constante. Assim, obtém-se a constante de velocidade aparente de pseudo primeira ordem (k_{obs}) seguindo a Equação 5.⁷²

$$v = k_{obs} [Cit\ c] \quad (5)$$

Onde v é a velocidade de reação e $[Cit\ c]$ é a concentração de ferricitocromo c . A k_{obs} pode ser obtida através do plot de $\ln(A_{\infty} - A)$ versus tempo (t), que resultará em uma reta cujo coeficiente angular é dado por k_{obs} . A constante de velocidade de segunda ordem (k) foi obtida correlacionando os valores de k_{obs} com as concentrações de Fe_3O_4 -NPs pela Equação 6.⁷²

$$k_{obs} = k [Fe_3O_4-NPs] \quad (6)$$

Onde k é a constante de velocidade de segunda ordem e $[Fe_3O_4-NPs]$ é a concentração de nanopartículas de Fe_3O_4 . Os experimentos foram conduzidos na ausência de luz, sob atmosfera inerte e atmosfera aberta com intuito de eliminar qualquer dúvida sobre a influência do oxigênio nas reações de redução.

A energia de ativação (E_a) foi obtida utilizando a equação de Arrhenius⁷³ (Equação 7) e construindo-se um gráfico que relaciona $\ln k$ com $1/T$, que resulta em uma reta com coeficiente angular $-E_a/R$. Parâmetros de ativação, tais como $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$, foram calculados através do gráfico de Eyring (Equação 8) que correlaciona $\ln(k/T)$ com $1/T$, resultando em uma reta com coeficiente angular correspondente a $-\Delta H^\ddagger/R$ e coeficiente linear igual a $\ln(k'/h) + \Delta S^\ddagger/R$, onde k' é a constante de Boltzmann, h é a constante de Planck, R é a constante universal dos gases ($8,3144\text{ J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$) e T é a temperatura do sistema dada em Kelvin.⁷²

$$k = Ae^{(-E_a/RT)} \quad (7)$$

$$\ln(k/T) = -\Delta H^\ddagger/RT + \ln(k'/h) + \Delta S^\ddagger/R \quad (8)$$

Os parâmetros termodinâmicos de interação entre o citocromo e as Fe_3O_4 -NPs foram calculados usando a equação de van't Hoff,⁷⁴ através da relação entre a energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) e o logaritmo natural da constante de associação ($\ln K_b$) (Equação 9 e 10), obtendo-se ΔH° e ΔS° . O valor de $\Delta G^\circ_{interação}$ foi determinado a partir da equação de Gibbs-Helmholtz (Equação 11).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (9)$$

$$\ln K_b = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R \quad (10)$$

$$\Delta G^\circ_{interação} = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (11)$$

4.7 Síntese e caracterização das nanopartículas de γ -Fe₂O₃

Nanopartículas de maghemita (γ -Fe₂O₃-NPs) do tipo *bare* foram sintetizadas seguindo um método já reportado.⁷⁵ Uma suspensão de Fe₃O₄-NPs (10 mL) previamente preparada foi oxidada à maghemita a partir de sua exposição à uma solução 4,0 mol L⁻¹ de ácido nítrico sob agitação durante 10 minutos. Em seguida, o precipitado foi magneticamente separado da suspensão, lavado repetidas vezes com água deionizada e misturado com uma solução 0,1 mol L⁻¹ de nitrato férrico sob agitação a 90 °C durante 30 minutos. O precipitado marrom (característico de maghemita) foi separado da solução e lavado continuamente com água deionizada. Finalmente, uma solução estoque (5 mg mL⁻¹) foi preparada dispersando as γ -Fe₂O₃-NPs em uma solução de tampão PBS 5 mmol L⁻¹ pH 7,4 (Equação 12).

Imagens de MET foram obtidas em um microscópio JEOL JEM-2100 operando a 200 kV. A amostra foi preparada gotejando-se uma suspensão diluída das nanopartículas em uma grade de cobre 400 mesh recoberta com um filme de carbono que, posteriormente, foi seca sob vácuo. O tamanho médio e o índice de polidispersividade foram determinados (baseados na contagem de 100 nanopartículas) utilizando o software de domínio público Image J. Os difratogramas foram coletados em um difratômetro Bruker D8 Advanced, com radiação de cobre ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e com variação do ângulo de varredura em um intervalo de $25^\circ < 2\theta < 100^\circ$, com passos de $0,02^\circ$ medidos a cada 10 segundos. O tamanho médio de partícula foi calculado com base nos três picos de refração mais intensos (311), (511) e (440), utilizando a equação de Scherrer (Equação 1).

4.8 Preparação e caracterização dos filmes de Langmuir e de Langmuir-Blodgett (LB)

As soluções lipídicas foram utilizadas sem purificação prévia. Foram escolhidas três moléculas fosfolipídicas para mimetizar a membrana mitocondrial, sendo elas: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPE) e 1,1',2,2'-tetramiristoil cardiolipina (CL). Inicialmente, foram preparadas soluções estoque de 1 mg mL⁻¹ de cada um dos fosfolipídios, onde o DPPC foi dissolvido em clorofórmio (grau HPLC), enquanto o DPPE e CL foram dissolvidos em uma mistura de metanol e clorofórmio. Em seguida, volumes apropriados de cada uma das soluções estoque foram misturados em uma

fração molar igual a 0,5:0,3:0,2 (DPPC:DPPE:CL) para se obter uma mistura ternária correspondente à composição da membrana mitocondrial biológica.⁷⁶

Os filmes de Langmuir foram preparados em cubas de Langmuir KSV Instruments® modelos minitrough (área superficial de 75 x 323 mm² e volume de 250 mL) equipadas com uma placa de Wilhelmy para medidas de pressão superficial, que se encontram em uma sala limpa classe 10 000, com temperatura controlada em 22 ± 1 °C. Para a obtenção dos filmes de Langmuir sem as nanopartículas (utilizados para experimentos-controle), espalhou-se essa mistura ternária (denominada DPPC-DPPE-CL) sobre a superfície de uma subfase aquosa de tampão PBS (pH 7,4) com auxílio de uma microsseringa Hamilton. Após o tempo necessário para que o solvente orgânico evaporasse (cerca de 10 minutos), as barreiras móveis da cuba foram comprimidas simetricamente numa velocidade de 10 cm² min⁻¹, até que a pressão de 30 mN m⁻¹ fosse atingida. Nessa pressão, o grau de empacotamento dos fosfolipídios corresponde ao de uma membrana biológica.⁷⁷ A partir daí, a pressão foi mantida constante, e o filme de Langmuir tipo Y formado (DPPC-DPPE-CL) foi depositado em um substrato sólido de ITO com taxa de transferência de 10 mm min⁻¹. Após a deposição, esperou-se 30 minutos para a secagem do filme e este foi armazenado por, no máximo 24 h, a 4 °C para futuros experimentos.

Para a preparação dos filmes de Langmuir com as nanopartículas utilizou-se o mesmo procedimento descrito acima, porém, neste caso, a mistura ternária foi depositada sobre uma subfase aquosa constituída de tampão PBS e uma mistura 0,5 mg mL⁻¹ de nanopartículas Fe₃O₄/γ-Fe₂O₃. O tempo de espera também foi de 10 minutos o que permitiu, além da secagem do solvente orgânico, a interação entre os fosfolipídios e as nanopartículas da subfase. O filme de Langmuir tipo Y formado (denominado DPPC-DPPE-CL-NPs) foi depositado em um substrato sólido de ITO e armazenado a 4 °C para futuros experimentos (Figura 8):

Figura 8 – Representação do processo de preparo do filme de Langmuir-Blodgett com a incorporação das nanopartículas de Fe₃O₄ e γ-Fe₂O₃.

Fonte: Autoria própria.

Os filmes obtidos foram caracterizados utilizando isotermas de pressão superficial segundo o método de Wilhelmy que, de forma resumida, utiliza-se de uma eletrobalaça para medir a força devida à tensão superficial exercida em uma placa de platina, vidro, mica, quartzo, ou, como no caso deste estudo, um papel filtro. Em geral, relaciona-se a pressão de superfície (π) – que é a diferença de tensão superficial entre a subfase (PBS puro) e da subfase com o filme – com a área ocupada pelo filme ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$), o que possibilita, obter informações sobre as fases do filme, como ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Formação de um filme de Langmuir durante os diferentes estágios de compressão.

Fonte: Autoria própria.

Ao espalhar a solução sobre a interface água/ar as moléculas estão totalmente dispersas sem interação entre si (denominada fase gasosa, G), com a compressão as moléculas que estão mais próximas começam a interagir entre si (conhecida como fase líquido-expandida, LE), o próximo estágio alcançado é a fase líquido-condensada (LC), onde as moléculas são forçadas a um arranjo regular. Por fim, após o ponto máximo de compactação das moléculas, ocorre o colapso (C) do filme, onde as moléculas começam a se agrupar de forma desordenada. A partir dos resultados das isotermas de pressão superficial, foram obtidas informações a respeito da incorporação das nanopartículas entre as moléculas fosfolipídicas.

Informações a respeito da conformação da cadeia, estrutura dos grupos e orientação molecular foram obtidas através da técnica de espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) em um equipamento KSV PMI 550. Nesta técnica a luz incidente é continuamente modulada em alta frequência entre polarizações

s (luz paralelamente polarizada) e p (luz perpendicularmente polarizada), permitindo medidas simultâneas em ambas as polarizações, sendo que a diferença entre elas fornece informações específicas da superfície do filme, enquanto a soma fornece o espectro de referência (Figura 10). Os experimentos foram realizados com um ângulo de incidência de 81° com uma média de 9000 espectros acumulados à uma resolução de 8 cm^{-1} .

Figura 10 – Ilustração esquemática do feixe de infravermelho com polarização p e s incidindo com ângulo igual a θ sobre um filme fino de Langmuir-Blodgett.

Fonte: Autoria própria.

As imagens de microscopia no ângulo de Brewster (BAM) foram obtidas em um EP4 imaging elipsômetro da empresa Accurion utilizando uma lente ultraobjetiva com ângulo de incidência e visualização de $53,1^\circ$, polarização de 2° e analisador em 10° . As imagens foram corrigidas geometricamente usando o software Data Studio da mesma empresa. Esta técnica permite o estudo *in situ* de filmes finos quanto sua morfologia e/ou separação de fases da monocamada em escala mesoscópica, baseando-se em processos de reflexão da luz. O set-up instrumental está ilustrado na Figura 11a. Para a obtenção das imagens de BAM, um feixe de luz com polarização p é incidido no ângulo de Brewster ($\sim 53^\circ$ para a água) na interface gás/líquido. Sob essas condições não ocorre reflexão da luz incidida. Entretanto, com a introdução de um filme fino nesta interface, as propriedades referentes ao índice de refração do sistema se alteram, permitindo que uma pequena quantidade de luz incidente seja refletida, sendo capturada por uma câmera sensível que irá compor uma imagem morfológica do filme (Figura 11b). As imagens podem ser obtidas nos diferentes estágios de compressão da monocamada, e as transições de fase do filme são evidenciadas pelo aparecimento de agregados lipídicos, denominados “domínios” (Figura 11c), fornecendo informações visuais a respeito da

morfologia, textura, ordenamento e separação de fases nos estágios G, LE, LC e C do filme.⁷⁸ Pode-se ainda, analisando-se os padrões de intensidade de reflexão da luz polarizada, obter informações de organização molecular das cadeias apolares dos fosfolipídios, já que o ângulo destas em relação ao plano de incidência do laser afeta seus valores de reflectância (maior reflectância se traduz em regiões mais claras nas imagens obtidas, enquanto menores reflectâncias gera o efeito contrário).

Figura 11 – (a) Representação do set-up experimental da microscopia no ângulo de Brewster; (b) Ilustração esquemática de um feixe de luz polarizada incidindo sobre um filme de Langmuir no ângulo de Brewster. Introduzindo-se um filme fino, as propriedades reflexivas do sistema são alteradas permitindo a composição de uma imagem morfológica; (c) Imagem morfológica da monocamada com destaque para os domínios lipídicos formados da ordem de 10 μm .

Fonte: Autoria própria.

4.9 Experimentos eletroquímicos

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato Autolab PGSTAT204 (Metrohm). A reação eletroquímica de oxirredução do cit c com as Fe_3O_4 -NPs foi estudada por voltametria cíclica (VC) em uma célula fechada, utilizando como contra-eletródo uma pequena placa de platina e, como eletródo de referência, empregou-se $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$. Como eletródo de trabalho utilizou-se ITO (óxido de estanho dopado com índio) com área geométrica de $0,400 \text{ cm}^2$.

Previamente a utilização do eletrodo de ITO, este foi tratado com uma solução básica de NH_4OH : H_2O_2 : H_2O na proporção de 1:1:6, respectivamente, a 70°C durante 10 minutos, para a limpeza do eletrodo. O eletrólito suporte utilizado foi uma solução tampão PBS $0,1\text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, na qual borbulhou-se argônio por 30 minutos previamente à obtenção dos voltamogramas. Estes foram obtidos a 25°C em um intervalo de potencial de $0,4\text{ V}$ à $-0,2\text{ V}$ (vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$) varridos à 5 mV s^{-1} por 10 ciclos voltamétricos, sendo apresentado apenas o último voltamograma obtido. O voltamograma de referência foi obtido apenas com o filme de Langmuir-Blodgett depositado sobre o eletrodo de ITO (referenciado como “filme LB”), um segundo eletrodo foi preparado contendo o filme de LB e sobre este filme foi depositado um filme de ferricitocromo c (referenciado como “filme LB + Cit c”) e, por fim, um terceiro eletrodo com um filme de ferricitocromo c depositado sobre o filme LB com nanopartículas incorporadas (referenciado como “filme NPs + LB + Cit c”) (Figura 12).

Todas as correntes obtidas nos experimentos foram normalizadas pela área geométrica do eletrodo, sendo apresentadas como densidade de corrente (j).

Figura 12 – Ilustração dos eletrodos utilizados nos experimentos de eletroquímica, sendo eles: filme LB, filme LB + Cit c e filme NPs + LB + Cit c, conforme a figura.

Fonte: Autoria própria.

4.10 Espectroscopia de absorção eletrônica *in situ*

Os resultados de espectroscopia de absorção na região do visível foram obtidos em um espectrofotômetro AvaSpec-2048 (com uma fonte de radiação deutério-halogênio) utilizando o módulo com fibras óticas para a condução do feixe de radiação. Os experimentos foram conduzidos na ausência de luz com um aparato instrumental montado segundo ilustrado na Figura 13. Primeiramente, uma pequena região da membrana lipídica contendo as nanopartículas no suporte de vidro foi isolada usando resina epóxi. Após secagem completa, $100\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de ferricitocromo c ($810\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS 5 mmol L^{-1} pH 7,4)

foi depositada sobre a região isolada entrando em contato com a membrana. Os experimentos de espectroscopia de absorção eletrônica *in situ* foram conduzidos a 25°C em uma faixa espectral entre 350 e 600 nm. O equipamento foi programado para realizar uma aquisição de sinal em absorbância a cada 20 segundos durante 30 min. Os resultados reportados são a média 200 acumulações com um tempo de integração de 20 ms.

Figura 13 – Esquema ilustrativo do aparato instrumental empregado nos experimentos de espectroscopia de absorção eletrônica *in situ* na região do visível.

Fonte: Autoria própria.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de Fe₃O₄

As nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄-NPs) foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, a partir da alcalinização controlada de uma solução contendo sais de ferro (III) e (II) na proporção 2:1 (Equação 13). O sistema foi mantido em atmosfera inerte (saturada de N₂) para evitar a formação de outras fases de óxidos de ferro e sob intensa agitação, minimizando gradientes de concentração de reagentes e de temperatura.

Imagens de MET (Figura 14a e b) indicaram a obtenção de um material majoritariamente esférico com um tamanho médio em torno de 10 ± 3 nm e índice de polidispersividade (σ) de 0,3 (Figura 14c). O método de coprecipitação, geralmente, não possibilita um controle rigoroso de tamanho e morfologia,⁷⁹ já que emprega uma rota sintética livre de moléculas orgânicas e/ou de surfactantes e procede em temperaturas relativamente baixas (cerca de 80 °C). Sendo assim, o valor obtido para o índice de polidispersividade se encontra no limiar daquele esperado para uma distribuição classificada como homogênea (segundo a literatura,^{80,81} uma suspensão é homogênea se $\sigma < 0,3$). Além disso, a natureza cristalina das Fe₃O₄-NPs sintetizadas pode ser observada pela presença dos planos cristalinos (311) distanciados em 2,5 Å nas imagens de MET (Figura 14d).

O perfil cristalográfico das nanopartículas foi avaliado utilizando-se a técnica de DRX (Figura 15). A posição e intensidade dos picos de difração obtidos é consistente em comparação com a ficha cristalográfica COD 1011032 referente ao padrão de magnetita em estado *bulk*. Os valores de distância interplanar ($d = 2,5299$ Å) e o parâmetro de rede a ($a = 8,39$ Å) calculados também são característicos para a magnetita. Os picos de difração em 2θ igual a 35,5° e 62,8° são correspondentes aos planos (311) e (440), respectivamente, indicando uma estrutura cúbica de espinélio inverso com tamanho médio de cristalito em torno de 9 ± 1 nm, calculado a partir da equação de Scherrer.⁶⁴ O valor calculado é condizente com a distribuição de tamanho determinada a partir de análise estatística das imagens de MET.

Figura 14 - (a) e (b) Imagens de MET das Fe_3O_4 -NPs sintetizadas; (c) Histograma e ajuste log-normal da distribuição de tamanho para as Fe_3O_4 -NPs (10 nm); (d) Imagem de MET evidenciando os planos cristalinos (311) que se distam em 2,5 Å.

Fonte: Autoria própria.

Figura 15 – Difratoograma referente às Fe_3O_4 -NPs sintetizadas (linha preta). Ficha cristalográfica COD 1011032 atribuída ao padrão de magnetita (linhas verticais em vermelho).

Fonte: Autoria própria.

O espectro de FTIR das Fe_3O_4 -NPs indicou, de fato, a obtenção de nanopartículas do tipo *bare*, já que este não apresenta sinais senão aqueles referentes somente à magnetita.

Observa-se no espectro dois picos característicos do estiramento Fe-O e dobramento angular Fe-O-Fe em 590 cm^{-1} e 430 cm^{-1} , respectivamente.⁶³ As bandas de absorção em 1627 cm^{-1} e 3415 cm^{-1} são atribuídas a deformação angular H-O-H e estiramento O-H, respectivamente, indicando a presença de moléculas de água adsorvidas nas nanopartículas (Figura 16a).

Experimentos de potencial zeta (ζ) e DLS forneceram informações a respeito da estabilidade coloidal e o perfil de distribuição de tamanho das Fe_3O_4 -NPs em suspensão. O valor de ζ obtido experimentalmente para a magnetita ($\zeta = -37,9 \pm 0,3\text{ mV}$) está de acordo com aquele relatado na literatura,⁸² indicando uma superfície carregada negativamente em pH neutro (7,4), acarretando elevada estabilidade coloidal para a suspensão, devido a repulsão dessas cargas. O diâmetro médio determinado para as Fe_3O_4 -NPs em suspensão é $19 \pm 2\text{ nm}$ e, considerando que os experimentos de DLS levam em conta o raio hidrodinâmico da partícula, o valor observado contém tanto contribuições de moléculas de água coordenadas à superfície das nanopartículas, como também expressa a agregação destas devido à sua alta energia superficial⁸³ (Figura 16b e c).

Figura 16 - (a) Espectro de FTIR; (b) potencial zeta e (c) perfil de distribuição do raio hidrodinâmico das Fe_3O_4 -NPs obtido por DLS.

Fonte: Autoria própria.

5.2 Transferência de elétrons entre nanopartículas de Fe₃O₄ e ferricitocromo c

Com intuito de verificar a possibilidade de aplicação das Fe₃O₄-NPs como miméticos do complexo citocromo bc₁, a espectroscopia na região do UV-vis foi utilizada para estudar a ET entre as mesmas e o cit c. Esta técnica possibilita a obtenção de informações acerca dos diferentes estados de oxidação do grupo heme, já que os espectros obtidos resultam das transições eletrônicas entre níveis de energia a partir da absorção de radiação eletromagnética pela proteína.⁸⁴

Os experimentos realizados indicaram que, quando a molécula de cit c oxidada entra em contato com as Fe₃O₄-NPs, ocorre uma transferência espontânea de elétrons das nanopartículas para o citocromo, concomitantemente, acarretando a redução do grupo prostético heme. Os espectros UV-vis dos estados oxidado e reduzido do cit c (conhecidos como ferricitocromo c (ferricit c) e ferrocitocromo c (ferrocit c), respectivamente) são mostrados na Figura 17a e b. Ambos espectros do ferri e ferrocitocromo c apresentam bandas de absorção características de proteínas⁸⁵ na região do ultravioleta, que são as ligações peptídicas em 230 nm e a absorção dos aminoácidos aromáticos em 280 nm. Proteínas que apresentam grupo prostético heme, como é o caso do cit c, exibem uma banda característica em 409 nm (conhecida como banda Soret) juntamente com uma banda de baixa intensidade em 356 nm e uma banda em 530 nm (banda Q) devido a absorção do anel porfirínico (Figura 17a e b, linhas azuis).

A banda Soret resulta dos momentos dipolares de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ dos orbitais $a_{1u} \rightarrow e_g$ e $a_{2u} \rightarrow e_g$ no anel porfirínico. Deslocamentos desta banda e da banda Q estão associados a mudanças conformacionais e de estados de oxidação do átomo de ferro neste grupo,⁸⁶ sendo assim, essas mudanças no perfil espectroscópico do cit c são úteis para o estudo da reação de redução da proteína. Após a adição das Fe₃O₄-NPs à solução de ferricitocromo c, a banda Soret e a banda em 356 nm se deslocam para 415 nm e 315 nm, respectivamente. A banda em 530 nm se divide em outras duas bandas definidas (denominadas como α e β , respectivamente, com proporção α/β de 1,87 em intensidade de absorção) em 550 nm ($\epsilon = 29,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 520 nm ($\epsilon = 15,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), como mostrado na Figura 17a e b (linhas vermelhas).

Os deslocamentos nas bandas de absorção são atribuídos a mudanças de estado de oxidação e/ou geometria do íon ferro coordenado ao anel porfirínico no grupo heme. No ferricitocromo c, o íon Fe³⁺ está hexacoordenado, com ligantes axiais para fora do plano, com um átomo de enxofre de um resíduo de metionina (Met(80)) e um átomo de nitrogênio de uma histidina (His(18)), apresentando geometria octaédrica.⁸⁷ Com a redução do grupo heme, no ferrocitocromo c, o Fe²⁺ pode manter seu estado hexacoordenado com ambos os resíduos de

His/Met (como geralmente acontece em condições fisiológicas),¹⁴ pode ainda manter seu estado hexacoordenado, porém com a troca do ligante de Met por outro resíduo de aminoácido (em geral, histidina ou lisina),⁸⁸ ou, por fim, pode ocorrer a ruptura total da ligação com a Met caracterizando um centro metálico alto-spin pentacoordenado.⁸⁹

Figura 17 - (a) Espectro de UV-vis do ferricitocromo c (●) e do ferrocitocromo c obtido após reação com as Fe₃O₄-NPs (●); (b) Região em escala expandida entre 500 nm e 600 nm.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 18 mostra a diminuição da banda de transferência de carga em torno de 700 nm atribuída à ligação Fe-S(Met) (transição $\text{Met}(\text{S}, \sigma) \rightarrow \text{Fe}(\text{d}_{yz})$)⁹⁰ enquanto ocorre a redução do ferricitocromo pelas Fe₃O₄-NPs. Observa-se que após aproximadamente 20 min. apenas uma pequena porcentagem de citocromo permanece oxidado. O rompimento da ligação Fe-S acarreta pequenas alterações ao redor do grupo heme, tais como, um pequeno aumento no comprimento de ligação Fe-N(His) (de 1,95 Å para 2,15 Å) e o deslocamento do resíduo de Met que gera uma fenda na região do grupo heme.⁹¹ Como dito anteriormente, em condições fisiológicas não é esperado o rompimento desta ligação, já que ligações de hidrogênio ao redor de grupo heme estabilizam o resíduo de Met.⁹² Porém a ligação Fe-S(Met) no ferrocitocromo c é mais fraca quando comparada ao ferricitocromo c, sendo assim, esta ligação pode ser rompida caso as ligações de hidrogênio sejam perturbadas por agentes externos, como exemplo, as nanopartículas. Apesar disso, com a redução do grupo prostético não se espera alterações significativas quanto à estrutura terciária da proteína como um todo, assim como indicam estudos da literatura.^{93,94} Apesar de observada nos espectros a diminuição desta banda característica, os resultados sugerem que o centro metálico mantém sua estrutura hexacoordenada, visto que não ocorre o aparecimento de uma banda em ~620 nm, bem como,

não observa-se o deslocamento hipsocrômico da banda Soret⁹⁵ (para 399 nm) relacionado ao estado de spin-alto do Fe.⁹⁶

A ruptura da ligação entre o centro metálico e o resíduo de metionina já é conhecido, porém alguns estudos^{97,98} indicam que este não é o único caminho de reação. Na ET homogênea (utilizando-se ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) como agente redutor) para o ferricitocromo c dois mecanismos são propostos: um ataque adjacente – que requer a abertura na fenda do grupo heme através da ruptura da ligação Fe-S – ou um ataque remoto indireto – envolvendo a porção exposta do anel porfirínico. A ET heterogênea também já foi previamente reportada na literatura⁹⁹ envolvendo MtoA (uma proteína citocromo do tipo c contendo dez grupos heme) e nanopartículas de $\text{Fe}_{3-x}\text{Ti}_x\text{O}_4$, sugerindo um acesso direto da proteína aos íons Fe^{2+} na superfície da nanopartícula. Esses resultados nos fornecem alguns indícios iniciais acerca do mecanismo de interação entre as Fe_3O_4 -NPs e o citocromo c.

Figura 18 – Espectro UV-vis mostrando a diminuição na banda de transferência de carga Fe-S indicando a ruptura dessa ligação devido à redução do grupo heme ao longo do tempo (●) 0 min., (●) 2 min., (●) 4 min., (●) 6 min., (●) 20 min.; Esquema representativo da estrutura do grupo heme no ferricitocromo c e no ferrocitocromo c, respectivamente.

Fonte: Autoria própria. PDB citocromo c (2B4Z).

Informações a respeito da estrutura secundária do citocromo c foram obtidas a partir de análises de dicroísmo circular (CD), que se trata de uma técnica comumente empregada na elucidação da quiralidade de compostos. O princípio da técnica baseia-se na diferença de absorção pela amostra entre uma luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda e, no caso das proteínas, essa diferença permite a identificação de porções α -hélice e folhas- β presentes nessas biomoléculas.¹⁰⁰ O cit c é uma proteína majoritariamente constituída de estrutura α -hélice, cuja função é intrinsicamente dependente de mudanças conformacionais, já que o grupo heme (responsável pelo transporte de elétrons) é diretamente afetado pelas mesmas.⁹⁹ A região espectral entre 260 nm e 200 nm no espectro de CD foi utilizada para obter informações acerca de modificações na estrutura secundária do cit c. A Figura 19a mostra os espectros de CD para ambos ferri e ferrocitocromo c, onde se observa uma pequena diminuição na intensidade de absorção da banda em 222 nm¹⁰¹ (banda tipicamente atribuída a estrutura α -hélice) antes (Figura 19a, linha azul) e após (Figura 19a, linha vermelha) a redução da proteína. A deconvolução do espectro mostrou uma diminuição de aproximadamente 4% no conteúdo α -hélico após a redução do grupo prostético (as porcentagens determinadas podem ser encontradas na Tabela 3), o que representa uma perda insignificante de estrutura, não influenciando, portanto, nas propriedades da proteína. Além disso, a região entre 320 nm e 260 nm (correspondente a absorção dos resíduos de triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe)) forneceu informações a respeito da estrutura terciária,^{100,102} já que modificações na cadeia polipeptídica podem alterar os “microambientes quirais” onde se encontram esses aminoácidos. Como pode ser observado na Figura 19b, ocorrem apenas mudanças sutis nos valores de elipticidade molar, bem como, nos deslocamentos de comprimentos de onda máximos do citocromo em estado oxidado (linha azul) e reduzido (linha vermelha). Isso é decorrente de pequenas movimentações de alguns aminoácidos aromáticos próximos ao resíduo de Met (80) após o rompimento da ligação Fe-S(Met), em especial, Phe (82), Tyr (67) e Trp (59) que se distanciam em 3,7 Å, 3,8 Å e 7,0 Å de resíduo Met (80), respectivamente. Entretanto, esta movimentação somente é necessária para “acomodar” de modo energeticamente favorável a Met pós-ruptura, não influenciando significativamente na estrutura terciária da proteína como um todo.⁹⁶ Por fim, a região do UV próximo (440-380 nm) fornece informações a respeito do grupo heme.¹⁰² Nota-se no espectro do ferricitocromo c a presença de uma banda com sinal positivo em ~401 nm e uma outra com sinal negativo em ~419 nm, devido ao efeito Cotton. Mudanças nesta última banda estão, frequentemente, associadas ao deslocamento do ligante Met axial no grupo heme,¹⁰³ de modo que, no espectro do

ferrocitocromo c esta banda praticamente desaparece, enquanto há o surgimento de uma única banda positiva em ~ 430 nm (Figura 19c), sugerindo uma possível troca de ligante axial em substituição à Met.^{104,105}

Figura 19 - Espectros de dicroísmo circular do ferricitocromo c (●) e ferrocitocromo c (●) no (a) ultravioleta distante (260-200 nm), (b) no ultravioleta médio (320-260 nm) e (c) no ultravioleta próximo (440-380 nm).

Fonte: Autoria própria.

Os resultados de CD estão em concordância com o observado pela espectroscopia vibracional da região do infravermelho (FTIR) do ferri e ferrocitocromo c, como mostrado na Figura 20a e b, respectivamente. Esta técnica pode ser usada para o monitoramento de mudanças nos modos vibracionais e rotacionais de uma determinada molécula, a partir da interação desta com a radiação eletromagnética na região do infravermelho, permitindo a caracterização de grupos funcionais a partir de suas frequências de vibração características.⁸⁴

Figura 20 - Deconvolução da banda amida I para ambos (a) ferricitocromo c, (b) ferrocitocromo c e (c) citocromo c adsorvido ((●) α -hélice, (●) folhas- β e (●) voltas- β).

Fonte: Autoria própria.

A região comumente denominada de amida I (entre 1700 cm^{-1} e 1600 cm^{-1}) tem sido amplamente utilizada para o estudo da estrutura secundária de proteínas e, através de métodos de deconvolução, é possível monitorar as mudanças nessas estruturas.²⁸ A porcentagem de cada uma das estruturas secundárias determinadas por FTIR, que correspondem a 56% de α -hélice e 24% de estrutura- β (folhas e voltas- β) para o ferricitocromo c, apresenta pequenas mudanças quando comparado às porcentagens de α -hélice (51%) e estrutura- β (27%) do ferrocitocromo c, indicando conservação da estrutura secundária da proteína. Além disso, após a reação entre as Fe_3O_4 -NPs e o ferricitocromo c, uma pequena porção das nanopartículas foi coletada, lavada com água destilada e seca sob vácuo. Em seguida, o espectro de FTIR dessas nanopartículas foi adquirido e este apresentou bandas referentes ao cit c que, possivelmente, ficou adsorvido nas nanopartículas. A deconvolução da amida I do citocromo adsorvido (Figura 20c) indicou que este adquire estrutura secundária muito semelhante à do ferrocitocromo c, contendo 54% de α -hélice e 30% de estrutura- β .

A Tabela 3 traz a relação entre as porcentagens das diferentes estruturas secundárias obtidas por ambas as técnicas utilizadas, bem como, uma comparação entre os valores para o ferri e ferrocitocromo c.

Tabela 3 – Comparação das porcentagens das estruturas secundárias obtidas por CD e FTIR

	CD		FTIR	
	Ferricit c	Ferrocit c	Ferricit c	Ferrocit c
α -hélice / %	52	48	56	51
Folhas e voltas- β / %	22	25	24	27

Fonte: Autoria própria.

5.3 Mecanismo de interação entre nanopartículas de Fe_3O_4 e ferricitocromo c

Com intuito de descrever as forças e mecanismo de interação entre as nanopartículas e o cit c, realizaram-se experimentos de DLS, potencial zeta e espectroscopia de fluorescência. Processos de fisissorção da proteína na superfície das nanopartículas também foram estudados utilizando a espectroscopia UV-vis.

Inicialmente, uma análise na sequência de aminoácidos feita pelo software ProtParam¹⁰⁶ mostrou uma carga positiva líquida de +8 para o cit c em pH fisiológico, em decorrência de seu alto conteúdo de aminoácidos carregados positivamente. Portanto, é razoável esperar que haja uma atração eletrostática mútua entre as nanopartículas e as moléculas

de proteína, acarretando processos de fisssorção, já que, conforme a medida de potencial zeta das Fe_3O_4 -NPs indicou, em pH neutro, estas apresentam uma superfície carregada negativamente ($\zeta = -37,9 \pm 0,3 \text{ mV}$) (ver Figura 16b e 21a, banda azul). De fato, as medidas realizadas indicaram que o citocromo c apresenta potencial zeta positivo ($\zeta = +7,5 \pm 0,6 \text{ mV}$) em pH 7,4, conforme apresentado na Figura 21a, banda vermelha. Entretanto, para uma suspensão contendo tanto Fe_3O_4 -NPs quanto citocromo c na proporção de 1:1, observa-se que o potencial zeta assume um valor intermediário ($\zeta = -26,2 \pm 0,4 \text{ mV}$) entre aqueles determinados para as ambas as espécies separadamente, sugerindo que parte das cargas superficiais foram anuladas a partir da mútua atração entre essas espécies, dando origem à um agregado Fe_3O_4 -NPs-Cit c (Figura 21a, banda preta).

Figura 21 – (a) Potencial zeta e (b) DLS das Fe_3O_4 -NPs livres (●), do cit c livre (●) e do sistema Fe_3O_4 -NPs -cit c (●); (c) Mapa de potencial eletrostático do citocromo c (visão frontal e posterior, respectivamente) indicando uma atração orientada entre o grupo heme e a superfície da nanopartícula, enquanto há, também, uma repulsão orientada entre a área posterior da proteína e a nanopartícula.

Fonte: Autoria própria. PDB citocromo c (2B4Z).

Esses resultados foram reforçados pelos valores de raio hidrodinâmico (d_h) determinados a partir das análises de DLS, onde se observa três distribuições de tamanho

diferentes correspondentes as moléculas da proteína não-adsorvidas ($3,2 \pm 1,8$ nm), o que é condizente com o tamanho já reportado na literatura para o cit c,¹⁰⁷ as Fe₃O₄-NPs livres (19 ± 2 nm) e ao sistema Fe₃O₄-NPs-Cit c (51 ± 2 nm), conforme apresentado na Figura 21b.

Além disso, o processo de fisissorção das moléculas de cit c na superfície das nanopartículas não é randômico, já que o mapa de potencial eletrostático do cit c (Figura 21c) – que mostra a separação de cargas por toda a molécula de proteína – nos leva a inferir que as forças eletrostáticas de atração induzem fortemente o contato direto entre a superfície das nanopartículas e a região do grupo prostético heme, já que a distribuição de cargas não é homogênea por toda a molécula, acarretando um acúmulo de resíduos de aminoácidos carregados positivamente, majoritariamente resíduos de lisina (Lis), histidina (His) e arginina (Arg), ao redor do grupo heme. Esta força de atração preferencial favorece a ET em condições de pH fisiológico, já que possibilita o acesso direto entre a extremidade do anel porfirínico e os íons de ferro na superfície da nanopartícula.

De fato, experimentos de fisissorção realizados com intuito de determinar a distribuição de citocromo livre em solução e adsorvido nas nanopartículas, baseados na diminuição da absorbância da proteína a partir das análises de UV-vis, também demonstraram que, nos primeiros 10 minutos de contato entre as espécies, cerca de 34% das moléculas de citocromo se adsorvem na superfície das Fe₃O₄-NPs. A concentração de moléculas de cit c livres em solução apresenta um decaimento exponencial com uma taxa de $-0,23 \text{ min}^{-1}$, segundo a equação $y = y_0 + A \exp(R_0 x)$, onde y é a relação $[\text{Cit c}]_{\text{não-adsorvido}}/[\text{Cit c}]_{\text{inicial}}$, y_0 é o valor mínimo atingido dessa relação (neste caso, 0,59), A é o valor inicial (0,38), x é o tempo e R_0 é a taxa de decaimento. A porcentagem de proteína adsorvida cresce até aproximadamente 41% em um período de 24 horas, atingindo um estado estacionário, onde não se observa posteriores alterações significativas na concentração da solução (Figura 22).

Quando comparado à cadeia respiratória mitocondrial, assim como observado em nosso sistema, as forças majoritárias de interação entre o cit c solúvel, os complexos III e IV e a superfície externa da membrana lipídica interna são também eletrostáticas,²⁰ o que permite a movimentação da proteína para o transporte de elétrons entre os complexos pela membrana mitocondrial.

Figure 22 – Decaimento exponencial da concentração de citocromo c em solução (concentração inicial de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) devido à fisissorção nas Fe_3O_4 -NPs ($432 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Fonte: Autoria própria.

Para se obter mais detalhes sobre como ocorre a interação entre o citocromo e as nanopartículas foram realizados experimentos de espectroscopia de fluorescência, já que nanopartículas, em geral, atuam como supressores da fluorescência de proteínas, como já mostrado em estudos prévios.^{108,109}

O mecanismo de supressão da fluorescência (conhecido como *quenching*) pode ser classificado como dinâmico ou estático,¹⁰⁹ ambos envolvem o contato direto entre o material supressor (do inglês, *quencher*) e o fluoróforo e podem ser diferenciados a partir de sua dependência com a temperatura do sistema. O mecanismo de supressão dinâmica depende de colisões entre o ligante (neste caso, a nanopartícula) e o fluoróforo em seu estado excitado (neste caso, o cit c), fazendo com que este retorne ao estado fundamental sem emissão de fótons. Como este mecanismo depende do choque entre moléculas, o aumento da temperatura do sistema favorece a difusão das espécies pela solução/suspensão e, conseqüentemente, a constante de supressão é aumentada. Já o mecanismo de supressão estático ocorre através da formação de um complexo não-fluorescente entre o ligante e o fluoróforo antes que este atinja o estado excitado, ou seja, no seu estado fundamental. Sendo assim, neste caso, a constante de supressão é inversamente proporcional ao aumento da temperatura do sistema, já que maiores temperaturas desestabilizam o complexo formado.¹¹⁰

Quando o cit c em solução é excitado em 300 nm, observa-se um espectro de emissão característico com uma banda intensa em 346 nm atribuída ao único resíduo de triptofano presente na molécula de cit c.⁷⁰ O triptofano (Trp) é um aminoácido apolar – altamente sensível

a alterações em escala molecular que ocorrem em seus arredores – e, já que o grupo prostético heme se distancia apenas 7,0 Å do resíduo de Trp no cit c, obtém-se informações relevantes sobre a interação nanopartícula-proteína através do seu espectro de emissão de fluorescência. A Figura 23 mostra o efeito de supressão na fluorescência do cit c com a adição de diferentes concentrações de Fe₃O₄-NPs (216, 259, 345, 432, 864 e 1296 µmol L⁻¹). Observa-se que a redução progressiva do máximo de emissão é proporcional à concentração de Fe₃O₄-NPs.

Em seguida, a natureza do mecanismo de supressão da fluorescência foi estudada a partir de experimentos realizados em três temperaturas diferentes (15, 25 e 35 °C) e os resultados foram analisados utilizando a equação de Stern-Volmer.⁷⁰

Figura 23 - Efeito da concentração de Fe₃O₄-NPs (●0, ●216, ●259, ●345, ●432, ●864 e ●1296 µmol L⁻¹) na supressão da fluorescência do citocromo c em 15, 25 e 35 °C.

Fonte: Autoria própria.

Conforme mostrado na Figura 24a, as curvas apresentam comportamento linear para concentrações de Fe₃O₄-NPs baixas, porém para concentrações mais elevadas, a curva distancia-se deste comportamento linear. Dessa forma, este efeito sustenta a hipótese de um mecanismo de supressão combinado em dinâmico e estático para altas concentrações de Fe₃O₄-NPs, enquanto somente um mecanismo de supressão dinâmico ocorre para baixas concentrações de Fe₃O₄-NPs. As constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) foram determinadas a partir

do coeficiente angular da porção linear no gráfico de Stern-Volmer (Figura 24b). Os valores de K_{sv} para cada temperatura estudada estão relacionados na Tabela 4, onde nota-se uma relação direta entre a temperatura absoluta e K_{sv} , reforçando a atuação de um mecanismo de interação dinâmico entre o citocromo e as Fe_3O_4 -NPs.

Figura 24 - (a) Gráfico de Stern-Volmer para interação das Fe_3O_4 -NPs com o cit c em diferentes temperaturas 15 °C (●), 25 °C (●) e 35 °C (●); (b) Intervalo linear das curvas de Stern-Volmer em diferentes temperaturas; (c) Relação entre $\log [(F_0 - F)/F]$ com a concentração das nanopartículas $\log c Fe_3O_4$ para o cálculo de n e K_b .

Fonte: Autoria própria.

Outro fator importante é a constante de supressão bimolecular (K_q), que reflete a acessibilidade do agente supressor ao fluoróforo e a eficiência de supressão. Em processos puramente dinâmicos, os valores de K_q atinge um máximo de $10^{10} L mol^{-1} s^{-1}$, porém os valores calculados para a interação Fe_3O_4 -NPs-cit c são da ordem de $10^{11} L mol^{-1} s^{-1}$ (Tabela 4), indicando que parte do agente supressor (Fe_3O_4 -NPs) interage associando-se ao fluoróforo (proteína), ou seja, através de um mecanismo de supressão estático,¹¹¹ gerando um complexo Fe_3O_4 -NPs-Cit c, o que corrobora com os resultados de fisissorção. Correlacionando $\log [(F_0 - F)/F]$ com a concentração do agente supressor $\log c Fe_3O_4$, onde F_0 e F são as intensidade de fluorescência da proteína na ausência e presença do supressor (neste caso, as nanopartículas),

respectivamente, o número de sítios de ligação por molécula de proteína (n) e a constante de associação (K_b) foram ser calculados (Figura 24c). Os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 4, onde observa-se um aumento de n e K_b com o aumento da temperatura do sistema. Isto ocorre, pois um aumento em T acarreta mudanças conformacionais na estrutura terciária da proteína, levando a maior exposição do resíduo de Trp e, por consequência, favorecendo interações entre as Fe_3O_4 -NPs e o cit c.

Tabela 4 – Parâmetros de interação para Fe_3O_4 -NPs-cit c em diferentes temperaturas.

$T / ^\circ\text{C}$	$K_{sv} \times 10^3 / \text{L mol}^{-1}$	$K_q \times 10^{11} / \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	n	$K_b \times 10^4 / \text{L mol}^{-1}$
15	2,9	2,9	1,4	6,4
25	4,2	4,2	1,7	68
35	5,2	5,2	1,8	114

Fonte: Autoria própria.

5.4 Estudo cinético e termodinâmico

Estudos cinéticos de reações de oxirredução envolvendo proteínas citocromo do tipo c têm sido realizados tanto em meio fisiológico quanto em não-fisiológicos e têm se mostrado de fundamental importância para o entendimento de suas funções biológicas.^{112,113} Neste estudo, parâmetros cinéticos da reação de redução do ferricitocromo c pelas Fe_3O_4 -NPs foram determinados utilizando-se a espectroscopia UV-vis *in situ*. A região espectral mais recomendada para tal é a banda Q (450-580 nm), devido a sua dependência intrínseca do estado de oxidação do átomo de ferro no grupamento heme.¹¹⁴ Os experimentos foram realizados sob regime de pseudo primeira ordem, no qual as Fe_3O_4 -NPs apresentavam concentração, no mínimo, 10 vezes maior que a concentração de proteína. Apesar disso, a reação de redução não se completou em todos os experimentos, o que também foi observado por Liu *et al.*,¹¹⁵ no estudo da redução de MtoA com complexos aquosos de Fe^{2+} . A explicação mais plausível para tal é que o equilíbrio termodinâmico é atingido antes que todo o ferricitocromo c seja reduzido, ao passo que a diferença de potencial redox entre as Fe_3O_4 -NPs e a proteína decresce até zero.

A Figura 25a retrata a formação de ferrocitocromo c ao longo do tempo com perfil exponencial em diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 40 °C). Correlacionando $\ln(A_\infty - A)$ com o tempo (t), obtém-se uma reta cujo coeficiente angular corresponde à constante de velocidade de pseudo primeira ordem (k_{obs}) (Figura 25b) e, por fim, correlacionando esta última com a concentração de Fe_3O_4 -NPs, obtém-se a constante de velocidade de segunda ordem (k) para a redução de ferricitocromo c em diferentes temperaturas (Figura 25c).

Figura 25 - (a) Formação de ferrocitocromo c ao longo do tempo; (b) Dependência do $\ln(A_\infty - A)$ com o tempo; (c) Dependência da constante de velocidade de pseudo primeira ordem com a concentração de Fe_3O_4 -NPs; (As cores denotam a temperatura dos experimentos, sendo elas: 25 °C (●), 30 °C (●), 35 °C (●) e 40 °C (●)); (d) Re-oxidação do ferrocitocromo c sob atmosfera inerte (●) e sob atmosfera saturada de O_2 (●).

Fonte: Autoria própria.

Nota-se um aumento em k com o aumento da temperatura, o que é um comportamento esperado para a maior parte das reações. Vale ressaltar que, sob as condições de trabalho, não é esperado que ocorra processos de desnaturação proteica, já que o cit c exibe estabilidade térmica no intervalo de temperatura estudado.¹¹⁶ O valor da constante de velocidade determinada em temperatura ambiente (25 °C) é $k = 2,63 \pm 0,05 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Para efeitos de comparação, a ET entre o citocromo bc_1 e o ferricit c na cadeia transportadora de elétrons pode chegar a $k = 1,7 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$,¹¹⁷ sendo esta uma velocidade extremamente elevada comparada ao nosso sistema bioinspirado.

Os experimentos cinéticos foram realizados na ausência de luz (com intuito de evitar qualquer processo de fotorredução da proteína, como já reportado pela literatura)¹¹⁸ e em atmosfera saturada de O_2 e de N_2 , respectivamente, entretanto, não houveram mudanças nos resultados obtidos em ambas as atmosferas, indicando que a redução do ferricitocromo c é exclusivamente atribuída às Fe_3O_4 -NPs. De fato, o comportamento de ambos ferri e

ferrocitocromo c foi estudado sob atmosfera saturada de O_2 e atmosfera inerte (N_2). Observa-se que, enquanto o ferricitocromo c não mostra qualquer alteração em seu estado de oxidação sob ambas as condições, o ferrocitocromo c tende a se reoxidar sob atmosfera de O_2 , porém com uma constante de velocidade de pseudo primeira ordem ($k_{obs} = 9,72 \times 10^{-7} s^{-1}$) cerca de 10 000 vezes mais lenta que a constante de pseudo primeira ordem calculada para a redução do ferricitocromo c pelas Fe_3O_4 -NPs ($k_{obs} = 1,74 \times 10^{-3} s^{-1}$). Este resultado indica que a reação de re-oxidação pelo O_2 atmosférico é cineticamente desfavorável quando comparada a reação de redução do ferricitocromo c. Ademais, sob atmosfera inerte, o ferrocitocromo c mantém seu estado reduzido, como já esperado (Figura 25d).

Os resultados cinéticos conjuntamente com a equação de Arrhenius foram utilizados para o cálculo da energia de ativação (E_a) da reação. A correlação entre o inverso da temperatura absoluta do sistema (dado em K^{-1}) com o $\ln$ das constantes de velocidade determinadas, resultou em um valor de energia de ativação de $E_a = 40,2 \pm 1,5 kJ mol^{-1}$ (Figura 26a). O valor de E_a obtido é cerca de 3 vezes maior quando comparado à energia necessária para a ET entre o complexo citocromo bc_1 e o cit c na cadeia respiratória mitocondrial ($14,8 kJ mol^{-1}$),¹¹⁹ o que denota maior dificuldade para que a reação aconteça quando as nanopartículas são utilizadas como reagentes, apesar disso, resultados reportados na literatura^{120–122} mostram que é comum observar valores de E_a relativamente maiores para materiais miméticos comparados à sistemas encontrados na natureza.

Figura 26 - (a) Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação; (b) Gráfico de Eyring para o cálculo dos parâmetros de ativação.

Fonte: Autoria própria.

Informações detalhadas sobre o mecanismo e os processos cinéticos de uma reação podem ser obtidas através do cálculo dos parâmetros de ativação, tais como entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) e entropia de ativação ($\Delta S^\ddagger$), baseados na teoria do estado de transição, já que alterações

nas propriedades dos reagentes que partem do estado fundamental e atingem o estado de transição podem ser descritas por esses parâmetros.¹²³ Através do gráfico de Eyring (Figura 26b) esses parâmetros foram determinados, sendo $\Delta H^\ddagger = + 37,9 \pm 1,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta S^\ddagger = - 109 \pm 6,34 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Em temperatura ambiente, E_a é aproximadamente $2,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ maior que $\Delta H^\ddagger$, o que se aproxima muito dos valores observados nos experimentos realizados. A entropia de ativação, em geral, apresenta valor alto e negativo para reações de segunda ordem bimoleculares e sua diminuição está associada à união das duas espécies reativas em um único complexo de transição, indicando um mecanismo associativo, no estado de transição, para a redução do ferricitocromo c pelas Fe_3O_4 -NPs.¹²⁴

Os experimentos de fluorescência forneceram informações sobre parâmetros termodinâmicos de interação Fe_3O_4 -NPs-Cit c. A equação de van't Hoff foi aplicada para calcular parâmetros termodinâmicos, tais como ΔH° e ΔS° , enquanto a equação de Gibbs-Helmholtz foi usada no cálculo de $\Delta G^\circ_{\text{interação}}$.⁷⁴ Construindo-se um gráfico que relaciona $\ln K_b$ com $1/T$ (Figura 27), ambos ΔH° e ΔS° podem ser determinados a partir do coeficiente angular da reta obtida e do intercepto do eixo y, respectivamente. Os valores de interação Fe_3O_4 -NPs-Cit c calculados estão dispostos na Tabela 5.

Figura 27 – Relação $\ln K_b$ e o inverso da temperatura absoluta para a determinação de ΔH° e ΔS° .

Fonte: Autoria própria.

Como observado na Tabela 5, $\Delta G^\circ_{\text{interação}}$ é negativo, logo trata-se de um processo espontâneo e termodinamicamente estável.¹²⁵ Como $\Delta H^\circ > 0$, o processo é endotérmico e favorecido entropicamente – já que a magnitude do valor determinado para ΔS° supera aquele calculado para ΔH° – o que é frequentemente relacionado à interações hidrofóbicas entre as duas espécies (neste caso, entre as Fe_3O_4 -NPs e o Cit c). Além disso, durante a interação NP-proteína, ocorre um deslocamento das moléculas de água que estão associadas às superfícies de

ambas as espécies,^{109,125} resultando em uma reorganização das moléculas de solvente de tal forma à acarretar um ΔS° positivo do sistema como um todo.¹²⁶

Tabela 5 – Parâmetros termodinâmicos de interação Fe₃O₄-NPs-cit c em diferentes temperaturas.

T / °C	ΔG° / kJ mol ⁻¹	ΔH° / kJ mol ⁻¹	T ΔS° / kJ mol ⁻¹
15	-25,9	+110,6	+136,5
25	-30,6		+141,2
35	-35,4		+146,0

Fonte: Autoria própria.

A Figura 28 ilustra a reação de redução do ferricitocromo c pelas Fe₃O₄-NPs. Isto requer um $\Delta G^\ddagger$ de +70,4 kJ mol⁻¹ e possui um ΔG° global de -55,3 kJ mol⁻¹ envolvendo contribuições das interações Fe₃O₄-NPs-Cit c (-30,6 kJ mol⁻¹) e do processo de ET (-24,7 kJ mol⁻¹).

Sendo assim, os resultados obtidos nos permitem inferir que as nanopartículas de Fe₃O₄ interagem com o citocromo c, induzindo uma ET espontânea, com contribuições majoritárias de forças eletrostáticas e hidrofóbicas. Interessantemente, este mecanismo é similar ao que ocorre na cadeia respiratória mitocondrial, entre o complexo III transmembranar e o citocromo c solúvel, já que estudos^{67,68} indicam que essas interações são mediadas principalmente por interações fracas e orientadas por forças eletrostáticas de longo alcance, incluindo contribuições específicas de moléculas de água para a formação de ligações de hidrogênio entre o cit bc₁ e cit c.

Finalmente, preservando as devidas proporções, observa-se um comportamento biomimético das nanopartículas de Fe₃O₄, apresentando propriedades de ET do complexo citocromo bc₁ frente ao citocromo c.

Figura 28 – Representação esquemática da reação de redução do ferricit c (I) pelas Fe_3O_4 -NPs (II), indicando as energias de $\Delta G^\ddagger$ e $\Delta G^\circ_{\text{interação}}$. A $\Delta G^\ddagger$ requer forças coulômbicas e de van der Waals entre as espécies, seguido da ET dos sítios de Fe^{2+} na superfície da NP para o grupo heme da proteína, resultando na formação de ferrocit c (III) e uma NP parcialmente oxidada (IV).

Fonte: Autoria própria. PDB citocromo c (2B4Z).

5.5 Síntese e caracterização das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

O estudo desenvolvido por Gao *et al.*,⁴⁴ que trata da atividade peroxidase intrínseca de nanopartículas de magnetita frente a alguns substratos orgânicos, indicou que a proporção de íons Fe^{2+} presentes na superfície das nanopartículas exerce papel fundamental nesta atividade catalítica, no sentido em que aumentando a quantidade de Fe^{2+} aumenta-se também a catálise dos substratos. Sendo assim, com o intuito de se investigar o papel dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na ET para o cit c, foram realizados experimentos com nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs).

As nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs) foram sintetizadas seguindo um método já reportado, a partir da oxidação de Fe_3O_4 -NPs em meio ácido.⁷⁵ Imagens de MET (Figura 29a e b) indicaram a obtenção de um material majoritariamente esférico com tamanho

médio em torno de 11 ± 3 nm e índice de polidispersividade (σ) de 0,2 (Figura 29c). A natureza cristalina do material obtido pode ser observada pela presença dos planos cristalinos (311) distanciados em 2,5 Å e dos planos (400) distanciados em 2,1 Å nas imagens de MET (Figura 29d).

Figura 29 - (a) e (b) Imagens de MET das γ -Fe₂O₃-NPs sintetizadas; (c) Histograma e ajuste gaussiano da distribuição de tamanho para as γ -Fe₂O₃-NPs (11 nm); (d) Imagem de MET evidenciando os planos cristalinos (311) e (400) que se distam em 2,5 Å e 2,1 Å, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

O perfil cristalográfico das γ -Fe₂O₃-NPs foi avaliado por DRX. A Figura 30 refere-se ao difratograma obtido. A posição e intensidade dos picos de difração obtidos é consistente em comparação com a ficha cristalográfica COD 9006316 referente ao padrão de maghemita em estado *bulk*. Apesar de não ser possível uma diferenciação precisa entre as fases de magnetita e maghemita pela técnica, devido a semelhanças dos padrões de difração, o parâmetro de rede a é condizente com o valor esperado para a estrutura cristalina da maghemita ($a = 8,33$ Å).

Figura 30 – Difrátograma referente às γ -Fe₂O₃-NPs sintetizadas (linha preta). Ficha cristalográfica COD 9006316 atribuída ao padrão de maghemita (linhas verticais em vermelho).

Fonte: Autoria própria.

Ademais, outras fases de óxidos de ferro apresentam padrões de difração completamente diferentes do obtido e representado na Figura 30, de tal forma, a justificar que o material sintetizado não se trata de outra fase senão a maghemita. Os picos de difração em 2θ igual a $35,5^\circ$ e $62,8^\circ$ são correspondentes aos planos (311) e (440), respectivamente, indicando uma estrutura cúbica de espinélio inverso com tamanho médio de cristalito em torno de 8 ± 3 nm, calculado a partir da equação de Scherrer.⁶⁴ O valor calculado é próximo daquele determinado a partir de análise estatística das imagens de MET.

5.6 Transferência de elétrons entre as nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e o ferrocitocromo c

Inicialmente, o comportamento das γ -Fe₂O₃-NPs foi estudado frente ao ferricit c. A Figura 31a mostra o resultado obtido através de duas análises diferentes sob as mesmas condições experimentais, com as Fe₃O₄-NPs e as γ -Fe₂O₃-NPs dispersas em uma solução de ferricit c. Ambos os experimentos foram conduzidos em atmosfera saturada de N₂ para evitar qualquer influência do oxigênio atmosférico. Observa-se que, enquanto as Fe₃O₄-NPs reagem com o ferrocitocromo reduzindo-o, as γ -Fe₂O₃-NPs não exibem nenhuma atividade frente ao cit c oxidado durante todo o experimento. A Figura 31b mostra que não houve alterações na região da banda Q (500-560 nm) no espectro de UV-vis em 0 min. e após 15 min. de contato entre as γ -Fe₂O₃-NPs e o ferricit c, indicando que o grupo heme na proteína permaneceu em estado oxidado.

Figura 31 - (a) Comparação da atividade redox das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e Fe_3O_4 na redução do ferricitocromo c; (b) Região da banda Q (500-600 nm) em 0 min. e 15 min. evidenciando que não houve alteração no estado de oxidação do grupo heme da proteína.

Fonte: Autoria própria.

Este resultado sugere que a atividade redox das Fe_3O_4 -NPs frente ao ferricit c é dependente da existência de íons Fe^{2+} superficiais que, possivelmente, são oxidados pela proteína, deixando a superfície da nanopartícula rica em Fe^{3+} após a reação, o que também foi observado por Gao *et al.*⁴⁴ Vale ressaltar que, em pH neutro, não é esperado lixiviação dos íons Fe^{2+} das nanopartículas para a solução, bem como, também não se espera atividade redox significativa do Fe^{2+} solúvel frente ao cit c, como já mostrado em estudos prévios.^{99,127}

Entretanto, um comportamento diferente é observado quando as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs são dispersas em uma solução de ferrocit c. Após cerca de 30 min. todo o ferrocit c foi oxidado à ferricit c com uma constante de velocidade de pseudo primeira ordem $k_{\text{obs}} = 1,55 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Esta velocidade é cerca de 10 vezes menor comparado à constante de velocidade de pseudo primeira ordem para a redução do ferricit c à ferrocit c pelas Fe_3O_4 -NPs ($k_{\text{obs}} = 1,74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Esta reação foi acompanhada *in situ* utilizando a espectroscopia UV-vis, conforme mostrado na Figura 32a. Nota-se ainda que a região espectral entre 380 nm e 740 nm apresenta 6 pontos isobésticos, sendo eles: 411, 439, 504, 527, 541 e 557 nm, o que está de acordo com o relatado na literatura.¹²⁸ Em um ponto isobéstico, as entidades moleculares em equilíbrio no meio reacional apresentam coeficientes de absortividade molar idênticos, dessa forma, neste ponto o valor de absorbância independe da concentração de ambas as espécies em equilíbrio (desde que a soma de suas respectivas concentrações seja mantida constante), indicando que a estequiometria das espécies é mantida constante e que não ocorrem reações secundárias – com formação de espécies intermediárias – no período de tempo considerado.¹²⁹ A presença de um ponto isobéstico tipicamente, mas não necessariamente, indica que apenas duas espécies

contribuem para a absorvância em um determinado comprimento de onda (neste caso, o equilíbrio ferrocitocromo c $\rightleftharpoons$ ferricitocromo c).

Figura 32 – (a) Oxidação do ferrocitocromo c pelas γ -Fe₂O₃-NPs ao longo do tempo. Os pontos isobésticos estão indicados por linhas rosas; (b) Deslocamento da banda Soret para comprimento de onda menores, indicando a oxidação do ferrocitocromo c; (c) Desaparecimento das bandas em 520 e 550 nm (que indicam um estado reduzido) e surgimento de uma única banda em 530 nm (indicando um estado oxidado); (d) Relação entre a absorvância normalizada das bandas em 530 nm e 550 nm com o tempo de reação.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se, conforme esperado, o deslocamento da banda Soret para comprimento de onda menores, indicando a progressiva oxidação do ferrocitocromo c à ferricitocromo c (Figura 32b). A Figura 32c mostra o comportamento da banda Q ao longo da reação onde, no tempo inicial, tem-se o citocromo em seu estado reduzido (ferrocitocromo c), porém conforme a reação entre este e as γ -Fe₂O₃-NPs se processa, observa-se o desaparecimento progressivo das bandas em 520 nm e 550 nm e o aparecimento de uma única banda em 530 nm (indicando o estado oxidado do grupo heme). O gráfico da Figura 32d relaciona as mudanças na intensidade

de absorção de ambas as bandas (530 nm e 550 nm) com o tempo, indicando o crescimento da banda em 530 nm com $k_{\text{obs}} = 1,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, ao passo que ocorre a diminuição da banda em 550 nm com $k_{\text{obs}} = 1,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Ademais, tem-se o aparecimento da banda de transferência de carga correspondente a ligação Fe-S(Met) em 700 nm, indicando que o centro metálico está se religando com o resíduo de aminoácido (Figura 33). Assim como postulado para a redução do ferricit c pelas Fe_3O_4 -NPs, após a oxidação do ferrocit c pelas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs, espera-se o efeito contrário, ou seja, um aumento na concentração de Fe^{2+} superficial.

Figura 33 – Espectro UV-vis indicando um aumento na banda de transferência de carga referente a ligação Fe-S(Met) em 700 nm enquanto o ferricitocromo c é formado.

Fonte: Autoria própria.

Assim como as interações do citocromo bc_1 com o cit c, as forças majoritárias de interação entre o cit c e o complexo citocromo c oxidase são de van der Waals (que contribuem para a formação do complexo cit c – cit oxidase) e eletrostáticas (que contribuem para a correta orientação do cit c facilitando a ET).⁷⁰ Portanto, a mesma associação utilizada para as Fe_3O_4 -NPs pode ser aplicada às $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs, no sentido de que, salva as devidas proporções, estas se comportam como miméticos redox do complexo Citocromo c oxidase (complexo IV) da cadeia respiratória mitocondrial.

Os resultados obtidos em solução que apresentam maior relevância estão todos sumarizados na Figura 34 abaixo:

Figura 34 – Esquema ilustrativo dos resultados obtidos da reação entre os óxidos de ferro nanoparticulados propostos e o citocromo c, ambos em solução.

Fonte: Autoria própria. PDB citocromo c (2B4Z).

5.7 Preparação e caracterização dos filmes de Langmuir-Blodgett

Com o intuito de se desenvolver um material bioinspirado na cadeia respiratória mitocondrial, fez-se necessário incorporar ambas as nanopartículas sintetizadas em um modelo de membrana celular que mimetizasse a membrana mitocondrial de forma simplificada, como representado nas Figuras 7 e 8. Para tal, foram escolhidas três moléculas fosfolipídicas para a preparação do modelo de membrana, sendo elas: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPE) e 1,1',2,2'-tetramiristoil cardiolipina (CL), que foram misturadas em uma fração molar de 0,5:0,3:0,2, respectivamente. Suas estruturas moleculares estão representadas na Figura 35.

Figura 35 – Estrutura molecular dos fosfolipídios empregados na preparação do modelo de membrana mitocondrial.

Fonte: Autoria própria.

Os filmes de Langmuir preparados foram caracterizados por suas isotermas de pressão superficial representadas na Figura 36a, onde se observa um perfil diferenciado na isoterma correspondente ao filme de Langmuir obtida da mistura DPPC-DPPE-CL quando comparado ao perfil apresentado pelos filmes de Langmuir dos compostos fosfolipídicos isolados. Essas isotermas evidenciaram a existência das fases gasosa, líquido-expandida, líquido-condensada e o colapso dos filmes. De forma geral, nos padrões obtidos a mistura DPPC-DPPE-CL alcança essas fases em áreas por molécula ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$) menores que o filme de CL (indicando que a CL forma uma monocamada menos compacta), enquanto, comparado aos filmes de DPPC e DPPE, a mistura alcançam as fases em $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ maiores (indicando que ambos DPPC e DPPE foram monocamadas mais compactas). Tomando como exemplo, a fase líquido-expandida, observa-se que para o filme de CL, esta se inicia em $228 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e termina em torno de $149 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, já para o filme de DPPC a fase iniciou-se em $115 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e terminou em torno de $63 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, para o filme de DPPE a fase iniciou-se em $61 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e terminou quando alcançou a faixa de $49 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, por fim, para a mistura

DPPC-DPPE-CL, esta fase iniciou-se em $121 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e terminou em torno de $75 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Mais especificamente, a compressão do filme DPPC-DPPE-CL iniciou em $176 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, onde também se deu início à fase gasosa. Nesta fase a pressão superficial se manteve constante em torno de $0,0 \text{ mN/m}$ até o início da fase líquido-expandida em $121 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Durante esta fase a pressão superficial cresceu alcançando o valor de 30 mN/m . A partir daí a pressão superficial aumentou rapidamente até 50 mN/m , indicando a fase líquido-condensada. Por fim, o filme atinge o colapso em $46 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$.

Figura 36 – (a) Isotermas de pressão superficial dos filmes de Langmuir de DPPC (●), DPPE (●), CL (●) e da mistura DPPC:DPPE:CL (●) em subfase de tampão PBS; (b) Isotermas de pressão superficial dos filmes de DPPC-DPPE-CL na ausência (●) e presenças das NPs (●) em subfase de tampão PBS.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 36b apresenta as isotermas de pressão superficial para os filmes de Langmuir obtidos na ausência e presença de uma mistura das Fe_3O_4 -NPs e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs na subfase de tampão PBS. Neste caso, observa-se que, enquanto o colapso da monocamada DPPC-DPPE-CL ocorreu em $46 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, para o filme na presença das nanopartículas (DPPC-DPPE-CL-NPs), o colapso ocorreu em $51 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Além disso, com a incorporação das NPs, a isoterma se deslocou para áreas por molécula maiores, indicando uma expansão da monocamada. Por exemplo, à 30 mN/m o valor correspondente à $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ se deslocou de $61 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para $66 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, após a incorporação das NPs na membrana lipídica.

A incorporação das NPs foi também evidenciada pelas imagens de BAM adquiridas em quatro estágios diferentes: em 0 mN/m (sem compressão), em 18 mN/m (na fase líquido-expandida/líquido-condensada), em 30 mN/m (pressão correspondente ao grau de empacotamento dos fosfolípidos de uma membrana biológica)⁷⁷ e em 60 mN/m (após o colapso da membrana). As imagens obtidas estão apresentadas na Figura 37, onde a primeira fila de

imagens (-) corresponde a membrana DPPC-DPPE-CL, enquanto a segunda fila (+) corresponde a membrana com as NPs (DPPC-DPPE-CL-NPs). Apesar das moléculas fosfolipídicas apresentarem duas regiões distintas – um pequeno grupo polar e uma longa cadeia apolar – as imagens de BAM resultam, majoritariamente, de processos de reflexão apenas das cadeias alquílicas apolares destas moléculas. Isso ocorre pois os grupamentos polares apresentam uma pequena área superficial (em comparação à cadeia apolar) e são altamente hidratados pela subfase aquosa, resultando em um índice de refração muito próximo ao da água.¹³⁰ Vale ressaltar que as NPs não absorvem radiação no comprimento de onda do laser utilizado, sendo assim, os domínios observados na Figura 37 são advindos exclusivamente das interações fosfolipídio-fosfolipídio (que são influenciadas diretamente pelas NPs).

Observa-se na fase gasosa ($P = 0$ mN/m) a inexistência de grandes domínios, tanto na ausência quanto na presença das NPs. Com a compressão da monocamada, a agregação dos fosfolipídios da subfase é promovida. Na ausência de NPs, as imagens apresentam um alto contraste “escuro-claro” devido ao efeito de anisotropia das propriedades reflexivas do sistema (por exemplo, em $P = 18$ mN/m), onde a reflectância da subfase é consideravelmente menor (regiões mais escuras) que a dos domínios (regiões mais claras), indicando um empacotamento ordenado das moléculas fosfolipídicas com suas cadeias alquílicas posicionadas paralelamente ao plano de incidência do laser.¹³¹ Já na presença das NPs, ocorre uma diminuição neste contraste entre a subfase e os domínios (em $P = 18$ mN/m), indicando que as cadeias apolares dos fosfolipídios estão mais inclinadas em relação ao ângulo de incidência do laser, sendo este um efeito direto da interação NP-fosfolipídio, como já observado na literatura.¹³²

Em termos de morfologia, observa-se que a incorporação das NPs interfere significativamente na forma e tamanho dos domínios na membrana obtida como, por exemplo, na fase LE/LC (em 18 mN/m), onde se observa duas morfologias diferentes na presença das NPs. Ademais, em 30 mN/m, a membrana DPPC-DPPE-CL apresenta morfologia compacta com domínios relativamente homogêneos quanto a tamanho e forma, o que não é observado na membrana DPPC-DPPE-CL-NPs. De fato, espera-se, para um mesmo valor de compressão (π), um filme menos compacto com a inserção das NPs, já que a isoterma de pressão superficial se deslocou para $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ maiores, indicam a expansão da monocamada (Figura 36b). Essas mudanças significativas nos padrões observados nas imagens de BAM reforçam a hipótese de incorporação das NPs no modelo de membrana mitocondrial.

Figura 37 – Imagens de BAM do filme DPPC-DPPE-CL coletadas em subfase de tampão PBS na ausência de NPS (-) e na presença de uma mistura Fe_3O_4 -NPs/ γ - Fe_2O_3 -NPs (+) em diferentes estágios de compressão da monocamada. Os *insets* mostram regiões selecionadas em escala expandida.

Fonte: Autoria própria.

Após os filmes de Langmuir serem transferidos para os suportes sólidos, gerando os filmes de Langmuir-Blodgett (LB), experimentos de espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) foram realizados com intuito de se estudar as interações entre as NPs e os fosfolipídios. A Figura 38 apresenta os espectros de PM-IRRAS para ambos os filmes DPPC-DPPE-CL e DPPC-DPPE-CL-NPs. Os espectros podem ser divididos em duas regiões principais: a região hidrofílica do fosfolipídio (entre 1800 cm^{-1} e 1000 cm^{-1}) (Figura 38) e a região correspondente aos grupos alquila dos fosfolipídios (entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1}) (Figura 39).

Na região polar observou-se um aumento considerável de intensidade na banda em 1244 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico do grupamento PO_2^- ,¹³³ conforme apresentada na Figura 38a. Analisando-se apenas a região entre 1800 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} (Figura 38b), observa-se que a incorporação das NPs acarreta alterações no espectro, principalmente em relação às intensidades de absorção.

Figura 38 – (a) Espectro de PM-IRRAS na região entre 1800 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} para os filmes DPPC-DPPE-CL (●) e DPPC-DPPE-CL-NPs (●); (b) Região entre 1800 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} ampliada; (c) e (d) Regiões isoladas entre 1800 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} para os filmes DPPC-DPPE-CL (●) e DPPC-DPPE-CL-NPs (●) para melhor visualização das bandas.

Fonte: Autoria própria.

Quando observados separadamente (Figuras 38c e d) essas diferenças ficam mais evidentes. Observa-se que a banda em 1745 cm^{-1} no filme DPPC-DPPE-CL, atribuída ao estiramento do grupo C=O dos fosfolipídios, é suprimida quanto a sua absorção, além de sofrer um deslocamento para um número de onda menor (1737 cm^{-1}), enquanto as bandas em 1676 cm^{-1} e 1603 cm^{-1} também atribuídas ao grupo C=O são significativamente suprimidas.¹³⁴ A banda centrada em 1554 cm^{-1} também sofre uma pequena supressão de intensidade de absorção, que está relacionada a uma reorientação das moléculas de água sob a membrana,¹³⁵ indicando que as NPs exercem influência na orientação dessas moléculas que se encontram nas proximidades da cabeça polar do fosfolipídio. Já as bandas em 1483 cm^{-1} e 1435 cm^{-1} atribuídas ao dobramento angular (tesoura) do grupo CH_2 ¹³⁶ não são fortemente afetadas quanto à intensidade, porém esta última apresenta deslocamento de 4 cm^{-1} para um número de onda

maior (1439 cm^{-1}). Conjuntamente esses resultados indicam que, de fato, as NPs interagem fortemente com a porção hidrofílica dos lipídios, especialmente em relação com grupo PO_2^- que tem sua intensidade de absorção aumentada em muitas vezes após a incorporação das NPs na membrana. Como a técnica de PM-IRRAS é dependente da orientação molecular, esta mudança na intensidade do grupo PO_2^- ($I_{\text{PO}_2^-}$) indica também uma mudança em sua orientação espacial no filme. Frequentemente, relaciona-se o aumento em $I_{\text{PO}_2^-}$ com um aumento no seu ângulo de inclinação em relação ao vetor normal na superfície do filme, desta forma, após a interação com as NPs, os grupamentos PO_2^- se encontram mais inclinados na membrana, isto indica um aumento no valor de $\text{\AA}^2/\text{molécula}$,¹³⁷ o que corrobora com os resultados obtidos nas isotermas de pressão superficial e de BAM.

A região do espectro correspondente à porção apolar (em essência, grupos CH_2 e CH_3) dos fosfolipídios também apresenta alterações significativas em suas bandas de absorção como resultado da incorporação das NPs, como mostrado na Figura 39.

Figura 39 – Espectro de PM-IRRAS da região entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} para os filmes DPPC-DPPE-CL (●) e DPPC-DPPE-CL-NPs (●).

Fonte: Autoria própria.

Observa-se nos espectros que a banda em 2966 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico do grupo CH_3 apresenta um deslocamento significativo de 16 cm^{-1} para um número de onda maior (2982 cm^{-1}) com a incorporação das NPs. De forma similar, a banda em 2919 cm^{-1} , atribuída ao estiramento assimétrico do grupo CH_2 , que se desloca 10 cm^{-1} para um número de onda maior (2929 cm^{-1}).¹³⁴ Outra alteração significativa foi observada nas bandas

correspondentes aos estiramentos simétricos dos grupos CH_3 e CH_2 em 2885 cm^{-1} e 2856 cm^{-1} ,¹³⁶ respectivamente, onde, para o filme DPPC-DPPE-CL observa-se bandas individuais para cada modo vibracional, enquanto que para o filme DPPC-DPPE-CL-NPs, a banda em 2885 cm^{-1} foi totalmente suprimida, enquanto a banda em 2856 cm^{-1} deslocou-se para 2858 cm^{-1} .

Além disso, relacionando-se as intensidades das bandas referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo CH_2 (I_s/I_{as}), obtém-se um parâmetro em relação a desordem das cadeias fosfolipídicas na membrana.¹³⁸ Neste caso, a relação para o filme DPPC-DPPE-CL é de $I_s/I_{as} = 0,52$, enquanto para o filme DPPC-DPPE-CL-NPs esta relação aumenta ($I_s/I_{as} = 0,65$), indicando que a incorporação das NPs acarreta um aumento na desordem das cadeias apolares dos fosfolipídios (aumento de conformação *gauche* ou dobras nas cadeias) levando à um empacotamento menos homogêneo da membrana,¹³⁵ o que corrobora com os resultados morfológicos obtidas a partir das imagens de BAM. Pode-se, ainda, relacionar o aumento de conformações *gauche* com um aumento na força de ligação C-H posicionada de forma *trans* à ligação C-C,¹³⁹ o que acarreta deslocamento das bandas correspondentes para maiores números de onda, como observado no espectro (Figura 39).

Portanto, os espectros de PM-IRRAS indicaram que a incorporação das NPs no filme induz alterações estruturais tanto nas porções hidrofílicas quanto nas hidrofóbicas dos fosfolipídios. Isso nos leva a inferir que as NPs estão localizadas entre as moléculas de fosfolipídios da membrana, assim como ocorre com os complexos III e IV da cadeia transportadora de elétrons.

5.8 Transferência de elétrons *in situ* da membrana bioinspirada frente ao citocromo c

Após a preparação dos filmes de Langmuir-Blodgett, o modelo de membrana inspirado na cadeia respiratória mitocondrial foi, de fato, testado quanto a sua capacidade em realizar ET frente ao citocromo c.

Inicialmente, a ET foi estudada utilizando-se técnicas eletroquímicas, mais em específico, a voltametria cíclica (VC). Os voltamogramas cíclicos obtidos estão apresentados na Figura 40. Observa-se que o filme LB sem as NPs (DPPC-DPPE-CL) não apresenta processo redox no intervalo de potencial varrido. O eletrodo de ITO contendo o filme LB (DPPC-DPPE-CL) e o ferricitocromo c também não apresenta processo redox, embora seja possível observar um efeito de queda ôhmica, já que a membrana fosfolipídica bloqueia parcialmente a ET entre o eletrodo e a proteína. Em contraste, para o filme LB com as NPs incorporadas (DPPC-DPPE-CL-NPs) observa-se um par redox quase-reversível ($E^{0'} = 57,5\text{ mV vs Ag/AgCl}_{\text{sat}}$) com pico

catódico em 10 mV e pico anódico em 123 mV relacionado ao par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ do grupo heme no citocromo c, indicando que, de fato, ocorre uma ET do modelo de membrana com as NPs incorporadas atuando como miméticos dos complexos III e IV para a proteína. Os potenciais observados estão em concordância com os relatados na literatura.^{140,141}

Figura 40 – Voltamogramas cíclicos para o filme DPPC-DPPE-CL (●), para o filme DPPC-DPPE-CL + Cit c (●) e para o filme DPPC-DPPE-CL-NPs + Cit c (●) obtidos em eletrodo de ITO sob atmosfera de argônio. (Velocidade de varredura: 5 mV; Eletrólito suporte: PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4; T = 25 °C).

Fonte: Autoria própria.

Conjuntamente com os resultados de VC, o processo de ET foi acompanhado *in situ* utilizando a espectroscopia eletrônica na região do visível. A Figura 41 se trata de uma foto em escala real do modelo de membrana sobre o suporte sólido empregado na detecção *in situ*.

Figura 41 – Filme de Langmuir-Blodgett DPPC-DPPE-CL-NPs sobre um suporte de vidro. Uma pequena região do filme foi isolada usando resina epóxi e, após secagem completa, uma solução de ferricitocromo c foi depositada sobre a região isolada entrando em contato com a membrana.

Fonte: Autoria própria.

Previamente à deposição da solução de proteína, um espectro de referência foi adquirido, sendo possível observar que o substrato não absorve radiação na região espectral sob estudo (Figura 42a, linha azul). Além disso, a membrana sem as NPs (DPPC-DPPE-CL) não exibiu atividade redox frente ao ferricitocromo c já que, mesmo após 15 minutos de contato entre ambos, não foram observadas alterações significativas no espectro da proteína, conforme mostrado na Figura 42a (linhas preta e vermelha). O contrário é observado para a membrana DPPC-DPPE-CL-NPs, após cerca de 15 minutos de contato entre a mesma e o ferricitocromo c, observa-se mudanças significativas no espectro da proteína, incluindo a separação da banda Q em duas bandas bem definidas em 520 nm e 550 nm, indicando a redução do grupo heme (Figura 42b).

Figura 42 – (a) Espectro de absorção eletrônica *in situ* na região do visível do substrato de vidro (●), da membrana DPPC-DPPE-CL + Cit c em 0 min. (●) e 15 min. (●); O *inset* mostra a região da banda Q expandida para melhor visualização; (b) Espectro de absorção eletrônica *in situ* na região do visível da membrana DPPC-DPPE-CL-NPs + Cit c em 0 min. (●) e 15 min. (●); O *inset* mostra a região da banda Q expandida para melhor visualização.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 43 apresenta uma proposta de incorporação das NPs no modelo de membrana de forma ilustrativa, bem como, o processo de ET em escala microscópica. Assim que a proteína é adicionada ao meio, parte das moléculas de citocromo c se adsorvem fisicamente nas nanopartículas devido às atrações eletrostáticas, que são as forças de interação majoritárias no sistema, enquanto outra parte das moléculas apenas colidem com estas. Ambos os processos resultam na ET direta entre os sítios de ferro da superfície nas nanopartículas e o grupo heme no citocromo c. Ao passo que as moléculas de ferricitocromo c interagem com as Fe_3O_4 -NPs, a concentração de íons Fe^{2+} superficiais nas nanopartículas decresce e a proteína reduz. Isto gera ferrocitocromo c que, por sua vez, irá interagir com as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs acarretando a reação oposta, ou seja, aumentando a concentração de íons Fe^{2+} nas nanopartículas e oxidando a

proteína. Este processo continua até que o sistema atinja o equilíbrio – o que ocorre em torno de 15 min. após o início da reação – depois disso nenhuma mudança aparente é observada no sistema devido, provavelmente, a presença de uma camada de moléculas de citocromo c adsorvidas na nanopartículas, o que causa impedimento estérico no acesso de novas moléculas de proteína às nanopartículas.

Figura 43 – Representação esquemática do modelo de membrana mitocondrial bioinspirado com as Fe_3O_4 -NPs (I) e as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs (II) mimetizando os complexos III e IV da cadeia respiratória, respectivamente. O ferricitocromo c está representado em vermelho (III) enquanto o ferrocitocromo c está em rosa (IV).

Fonte: Autoria própria. PDB citocromo c (2B4Z).

6 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou o desenvolvimento de um sistema mimético de uma das etapas da cadeia respiratória mitocondrial, bem como uma proposta mecanística no nível molecular acerca da transferência de elétrons (ET) heterogênea entre óxidos de ferro nanoparticulados e o citocromo c. Observou-se que nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4 -NPs) esféricas e majoritariamente cristalinas se comportam como miméticos redox do complexo III (citocromo bc_1), reduzindo ferricitocromo c à ferrocitocromo c através de uma ET direta entre os sítios de Fe^{2+} na superfície da nanopartícula e o grupo prostético heme. Por outro lado, nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs), também esféricas e cristalinas, atuam como miméticos redox do complexo IV (citocromo c oxidase), ou seja, oxidam ferrocitocromo c através de uma ET direta entre os sítios superficiais de Fe^{3+} na nanopartícula e o grupo heme na proteína. Ambos os processos de ET não alteram significativamente as estruturas secundária e terciária do citocromo c, de forma a manter suas propriedades elétron-transportadoras. As interações nanopartícula-proteína são, em sua maioria, eletrostáticas – que favorecem a ET por possibilitarem o acesso direto entre a extremidade do anel porfirínico e os íons ferro na superfície das nanopartículas – e de van der Waals com contribuições de ligações de hidrogênio, o que se assemelha ao observado entre o citocromo c solúvel e os complexos III e IV na cadeia transportadora de elétrons. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos indicaram um mecanismo associativo no estado de transição e uma reação favorecida entropicamente para a redução do ferricitocromo c pelas Fe_3O_4 -NPs. Por fim, quando incorporadas em um modelo de membrana mitocondrial, as nanopartículas permaneceram eletroquimicamente ativas frente ao citocromo c se comportando como complexos proteicos em um modelo de membrana celular. Vislumbra-se, assim, que estes resultados abram novas possibilidades para o desenvolvimento de materiais bioinspirados mais sofisticados e robustos para estudos científicos e aplicações tecnológicas.

REFERÊNCIAS

- 1 KUMAR, A.; HSU, L. H.-H.; KAVANAGH, P.; BARRIÈRE, F.; LENS, P. N. L.; LAPINSONNIÈRE, L.; LIENHARD, J. H.; SCHRODER, U.; JIANG, X.; LEECH, D. The ins and outs of microorganism-electrode electron transfer reactions. **Nature Reviews Chemistry**, London, v. 1, n. 24, p. 1-13, 2017.
- 2 BALASUBRAMANIAN, V.; POILLUCCI, A.; CORREIA, A.; ZHANG, H.; CELIA, C.; SANTOS, H. A. Cell membrane-based nanoreactor to mimic the bio-compartmentalization strategy of a cell. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, Washington, v. 4, n. 4, p. 1471-1478, 2018.
- 3 BALASUBRAMANIAN, V.; CORREIA, A.; ZHANG, H.; FONTANA, F.; Biomimetic engineering using cancer cell membranes for designing compartmentalized nanoreactors with organelle-like functions. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 29, n. 11, p. 1-7, 2017.
- 4 STANO, P. Synthetic biology of minimal living cells: primitive cell models and semi-synthetic cells. **Systems and Synthetic Biology**, Berlin, v. 4, n. 3, p. 149-156, 2010.
- 5 LENAU, T. A.; METZE, A. L.; HESSELBERG, T. Paradigms for biologically inspired design. **Proceedings of SPIE: bioinspiration, biomimetics, and bioreplication VIII**, Bellingham, v. 10593, p. 1-20, 2018. Trabalho apresentado na SPIE Smart Structures and Materials + Nondestructive Evaluation and Health Monitoring, 2018, Denver.
- 6 KEASLING, J. D. Synthetic biology for synthetic chemistry. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 3, n. 1, p. 64-76, 2008.
- 7 OTRIN, L.; MARUSIC, N.; BEDNARZ, C.; VIDAKOVIC-KOCH, T.; LIEBERWIRTH, I.; LANDFESTER, K.; SUNDMACHER, K. Toward artificial mitochondrion: mimicking oxidative phosphorylation in polymer and hybrid membranes. **Nano Letters**, Washington, v. 17, n. 11, p. 6816-6821, 2017.
- 8 LIU, P.; LIANG, P.; JIANG, Y.; HAO, W.; MIAO, B.; WANG, D.; HUANG, X. Stimulated electron transfer inside electroactive biofilm by magnetite for increased performance microbial fuel cell. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 216, p. 382-388, 2018.
- 9 BLUMBERGER, J. Recent advances in the theory and molecular simulation of biological electron transfer reactions. **Chemical Reviews**, Washington, v. 115, n. 20, p. 11191-11238, 2015.
- 10 FERREIRA, K. N.; IVERSON, T. M.; MAGHLAOU, K.; BARBER, J.; IWATA, S. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. **Science**, Washington, v. 303, p. 1831-1838, 2004.
- 11 HIRST, J. Mitochondrial complex I. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 82, n. 1, p. 551-575, 2013.
- 12 WHITE, G. F.; SHI, Z.; SHI, L.; WANG, Z.; DOHNALKOVA, A. C.; MARSHALL, M. T.; FREDERICKSON, J. K.; ZACHARA, J. M.; BUTT, J. N.; RICHARDON, D. J.; CLARKE, T. A. Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe(III) minerals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 16, p. 6346-6351, 2013.
- 13 ANDREINI, C.; BERTINI, I.; CAVALLARO, G.; HOLLIDAY, G.; THORNTON, J. M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme database to general principles. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Berlin, v. 13, n. 8, p. 1205-1218, 2008.

- 14 LIU, J.; CHAKRABORTY, S.; HOSSEINZADEH, P.; YU, Y.; TIAN, S.; PETRIK, I.; BHAGI, A.; LU, Y. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 8, p. 4366-4369, 2014.
- 15 SOLOMON, E. I.; XIE, X.; DEY, A. Mixed valent sites in biological electron transfer. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 37, n. 4, p. 623-638, 2008.
- 16 PLETNEVA, E. V.; CRNOGORAC, M. M.; KOSTIC, N. M. Mimicking biological electron transport in sol-gel glass: photoinduced electron transfer from zinc cytochrome c to plastocyanin or cytochrome c mediated by mobile inorganic complexes. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 124, n. 48, p. 14342-14354, 2002.
- 17 MEGIATTO, J. D.; ANTONIUK-PABLANT, A.; SHERMAN, B. D.; KODIS, G.; GERVALDO, M.; MOORE, T. A.; MOORE, A. L.; GUST, D. Mimicking the electron transfer chain in photosystem II with a molecular triad thermodynamically capable of water oxidation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 39, p. 15578-15583, 2012.
- 18 YU, J.; HORSLEY, J. R.; ABELL, A. D. Unravelling electron transfer in peptide-cation complexes: a model for mimicking redox centres in proteins. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 22, p. 8409-8417, 2020.
- 19 RAANAN, H.; PIKE, D. H.; MOORE, E. K.; FALKOWSKI, P. G.; NANDA, V. Modular origins of biological electron transfer chains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 115, n. 6, p. 1280-1285, 2018.
- 20 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005. 1119 p.
- 21 WIKSTROM, M.; SHARMA, V.; KAILA, V. R.; HOSLER, J. P.; HUMMER, G. New perspectives on proton pumping in cellular respiration. **Chemical Reviews**, Washington, v. 115, n. 5, p. 2196-2221, 2015.
- 22 RICH, P. R.; MARÉCHAL, A. The mitochondrial respiratory chain. **Essays in Biochemistry**, London, v. 47, p. 1-23, 2010.
- 23 SOUSA, J. S.; D'IMPRIMA, E.; VONCK, J. Mitochondrial respiratory chain complexes. **Subcellular Biochemistry**, Berlin, v. 87, p. 167-227, 2018.
- 24 MANEG, O.; MALATESTA, F.; LUDWIG, B.; DROSOU, V. Interaction of cytochrome c with cytochrome oxidase: two different docking scenarios. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1655, p. 274-281, 2004.
- 25 VEDEL, F.; LALANNE, E.; SABAR, M.; CHÉTRIT, P.; PAEPE, R. The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: composition, structure and mutational studies. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 37, n. 9, p. 629-643, 1999.
- 26 BERTINI, I.; CAVALLARO, G.; ROSATO, A. Cytochrome c: occurrence and functions. **Chemical Reviews**, Washington, v. 106, n. 1, p. 90-115, 2006.
- 27 YEAGLE, P. L. Membrane proteins. In: YEAGLE, P. L. **The membrane of cells**. 3 ed. Amsterdam: Academic Press, 2016. 452 p.

- 28 YANG, H.; YANG, S.; KONG, J.; DONG, A.; YU, S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. **Nature Protocols**, London, v. 10, n. 3, p. 382-396, 2015.
- 29 PELLETIER, H.; KRAUT, J. Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c. **Science**, Washington, v. 258, n. 5089, p. 1748-1755, 1992.
- 30 SUTIN, N. Electron transfer reactions of cytochrome c. *In*: RAYMOND, K. N. **Bioinorganic Chemistry – II**. Washington: American Chemical Society, 1977. 448 p.
- 31 SUTIN, N.; YANDELL, J. K.; Mechanisms of the reactions of cytochrome c. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 247, n. 21, p. 6932-6936, 1972.
- 32 SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Inorganic Chemistry**. 5 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2009. 824 p.
- 33 HOCELLA, M. F.; LOWER, S. K.; MAURICE, P. A.; PENN, R. L.; SAHAI, N.; SPARKS, D. L.; TWINING, B. S. Nanominerals, mineral nanoparticles, and earth systems. **Science**, Washington, v. 319, n. 5870, p. 1631-1635, 2008.
- 34 ANSARI, S. A. M. K.; FICIARÀ, E.; RUFFINATTI, F. A.; STURA, I.; ARGENZIANO, M.; ABOLLINO, O.; CAVALLI, R.; GUIOT, C.; D'AGATA, F. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and functionalization for biomedical applications in the central nervous system. **Materials**, Basel, v. 12, n. 465, p. 1-24, 2019.
- 35 MIRABELLO, G.; LENDERS, J. J. M.; SOMMERDIJK, N.A. J. M. Bioinspired synthesis of magnetic nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 45, n. 18, p. 5085-5106, 2016.
- 36 PHAN, M-H.; ALONSO, J.; KHURSHID, H.; LAMPEN-KELLEY, P.; CHANDRA, S.; REPA, K. S.; NEMAT, Z.; DAS, R.; IGLESIAS, O.; SRIKANTH, H. Exchange bias effects in iron oxide-based nanoparticle systems. **Nanomaterials**, Basel, v. 6, n. 11, p. 1-30, 2016.
- 37 CHERTOK, B.; MOFFAT, B. A.; DAVID, A. E.; YU, F.; BERGEMANN, C.; ROSS, B. D.; YANG, V. C. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 487-496, 2008.
- 38 RANGANATH, K. V. S.; GLORIUS, F. Superparamagnetic nanoparticles for asymmetric catalysis – a perfect match. **Catalysis Science and Technology**, London, v. 1, n. 1, p. 13-22, 2011.
- 39 MODENEZ, I. A.; SASTRE, D. E.; MORAES, F. C.; MARQUES NETTO, C. G. C. Influence of glutaraldehyde cross-linking modes on the recyclability of immobilized lipase B from *Candida antarctica* for transesterification of soy bean oil. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 9, p. 1-16, 2018.
- 40 QIU, J-D.; PENG, H-P.; LIANG, R-P.; XIA, X-H. Facile preparation of magnetic core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticle/myoglobin biofilm for direct electrochemistry. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 25, n. 6, p. 1447-1453, 2010.
- 41 GU, H.; XU, K.; XU, C.; XU, B. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. **Chemical Communications**, London, n. 9, p. 941-949, 2006.
- 42 LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical Reviews**, Washington, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, 2008.

- 43 KHANNA, L.; VERMA, N. K.; TRIPATHI, S. K. Burgeoning tool of biomedical applications – superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds**, Amsterdam, v. 752, p. 332-353, 2018.
- 44 GAO, L.; ZHUANG, J.; NIE, L.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; GU, N.; WANG, T.; FENG, J.; YANG, D.; PERRETT, S.; YAN, X. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. **Nature Nanotechnology**, London, v. 2, p. 577-583, 2007.
- 45 CAO, D.; HE, P.; HU, N. Electrochemical biosensors utilizing electron transfer in heme proteins immobilized on Fe₃O₄ nanoparticles. **Analyst**, London, v. 128, n. 10, p. 1268-1274, 2003.
- 46 KONHAUSER, K. O.; KAPPLER, A.; RODEN, E. E. Iron in microbial metabolisms. **Elements**, Quebec, v. 7, n. 2, p. 89-93, 2011.
- 47 EMERSON, D.; FLEMING, E. J.; MCBETH, J. M. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 64, n. 1, p. 561-583, 2010.
- 48 MARTINS, M. V. A.; BONFIM, C.; SILVA, W. C.; CRESPILO, F. N. Iron (III) nanocomposites for enzyme-less biomimetic cathode: a promising material for use in biofuel cells. **Electrochemistry Communications**, Amsterdam, v. 12, n. 11, p. 1509-1512, 2010.
- 49 LILJEBLAD, J. F. D. **Biomimetic membranes: molecular structure and stability studies by vibrational sum frequency spectroscopy**. 2010. 52 f. Licentiate Thesis in Chemistry – Swedish Center for Biomimetic Fiber Engineering, KTH Chemical Science and Engineering, Stockholm, 2010.
- 50 VANCE, J. E.; VANCE, D. E. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 82, n. 1, p. 113-128, 2004.
- 51 GERALDO, V. P. N. **Interação do ibuprofeno e capsaicinóides com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett contendo fosfolípidios**. 111 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.
- 52 LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 39, n. 9, p. 1848-1906, 1917.
- 53 PENG, J. B.; BARNES, G. T.; GENTLE, I. R. The structures of Langmuir-Blodgett films of fatty acids and their salts. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 163-219, 2001.
- 54 ALBRECHT, O. The construction of a microprocessor-controlled film balance for precision measurement of isotherms and isobars. *In*: ROBERTS, G. G.; PITT, C. W. **Langmuir-Blodgett films**. 3 ed. Amsterdam, Elsevier, 1982. 329 p.
- 55 BREZESINSKI, G.; MOHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 100-102, p. 563-584, 2003.
- 56 SCHWARTZ, D. K. Langmuir-Blodgett film structure. **Surface Science Reports**, Amsterdam, v. 27, n. 7-8, p. 245-334, 1997.
- 57 PAVINATTO, F. J. **Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)**. 163 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.

- 58 OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; RAPOSO, M.; DHANABALAN, A. Langmuir-Blodgett (LB) and self-assembled (SA) polymeric films. *In*: NALWA, H. S. **Handbook of surfaces and interfaces of materials**. New York: Academic Press, 2001. 604 p.
- 59 MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta** – reviews on biomembranes, Amsterdam, v. 1286, n. 3, p. 183-223, 1996.
- 60 FENG, S-S. Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure-area measurement of the monolayer at the air-water or oil-water interface. **Langmuir**, Washington, v. 15, n. 4, p. 998-1010, 1999.
- 61 BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? **Current Opinion in Structural Biology**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 438-443, 1999.
- 62 PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, Weinheim, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- 63 SANTOS, G. P.; MELO, A. F. A. A.; CRESPILO, F. N. Magnetically controlled single-nanoparticle detection *via* particle-electrode collisions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 16, n. 17, p. 8012-8018, 2014.
- 64 HOLZWARTH, U.; GIBSON, N. The Scherrer equation versus the “Debye-Scherrer equation”. **Nature Nanotechnology**, London, v. 6, n. 9, p. 534, 2011.
- 65 FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundária de proteínas. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 146-150, 1998.
- 66 BANDEKAR, J. Amide modes and protein conformation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** – protein structure and molecular enzymology, Amsterdam, v. 1120, n. 2, p. 123-143, 1992.
- 67 CAMERON, D. G.; MOFFATT, D. J. A generalized approach to derivative spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, New Market, v. 41, n. 4, p. 539-544, 1987.
- 68 PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. 5 ed. Stamford: Cengage Learning, 2013. 690 p.
- 69 JOHS, A.; SHI, L.; DROUBAY, T.; ANKNER, J. F.; LIANG, L. Characterization of the decaheme c-type cytochrome OmcA in solution and on hematite surfaces by small angle x-ray scattering and neutron reflectometry. **Biophysical Journal**, Amsterdam, v. 98, n. 12, p. 3035-3043, 2010.
- 70 LAKOWICZ, J. R. **Principals of fluorescence spectroscopy**. 3 ed. New York: Springer, 2006. 954 p.
- 71 LAKOWICZ, J. R.; WEBER, G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. **Biochemistry**, Washington, v. 12, n. 21, p. 4161-4170, 1973.
- 72 LAIDLER, K. J. **Chemical kinetics**. 3 ed. Noida: Pearson Education Inc., 1987. 531 p.
- 73 MENZINGER, M.; WOLFGANG, R. The meaning and use of the Arrhenius activation energy. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 8, n. 6, p. 438-444, 1969.

- 74 HU, Y-J.; LIU, Y.; SHEN, X-S. FANG, X-Y.; QU, S-S. Studies in the interaction between 1-hexylcarbonyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 738, n. 1-3, p. 143-147, 2005.
- 75 NURDIN, I.; JOHAN, M. R.; YAACOB, I. I.; ANG, B. C. Effect of nitric acid concentrations on synthesis and stability of maghemite nanoparticles suspension. **Scientific World Journal**, London, v. 2014, p. 1-6, 2014.
- 76 HORVATH, S. E.; DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Progress in Lipid Research**, Amsterdam, v. 52, n. 4, p. 590-614, 2013.
- 77 PEETLA, C.; STINE, A.; LABHASETWAR, V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 6, n. 5, p. 1264-1276, 2009.
- 78 DAEAR, W.; MAHADEO, M.; PRENNER, E. J. Applications of Brewster angle microscopy from biological materials to biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1859, n. 10, 1749-1766, 2017.
- 79 HYEON, T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. **Chemical Communications**, London, n. 8, p. 927-934, 2003.
- 80 SADEGHI, R.; ETEMAD, S.; KESHAVARZI, E. Investigation of alumina nanofluid stability by UV-vis spectrum. **Microfluid Nanofluid**, Berlin, v. 18, n. 5-6, p. 1023-1030, 2015.
- 81 MAHBUBUL, I. M. Stability and dispersion characterization of nanofluid. In: MAHBUBUL, I. M. **Preparation, characterization, properties and applications of nanofluid**. New York: W. H. Freeman, 2019. 374 p.
- 82 BARRETO, G. R.; KAWAI, C.; TOFANELLO, A.; NEVES, A. A. R.; ARAUJO-CHAVES, J. C.; BELLETI, E.; LANFREDI, A. J. C.; CRESPILO, F. N.; NANTES-CARDOSO, I. L. Magnetoliposomes as model for signal transmission. **Royal Society Open Science**, London, v. 6, n. 181108, p. 1-14, 2019.
- 83 MAHBUBUL, I. M.; ELCIOGLU, E. B.; SAIDUR, R.; AMALINA, M. A. Optimization of ultrasonication period for better dispersion and stability of TiO₂-water nanofluid. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 37, p. 360-367, 2017.
- 84 PIKE, E. R. Introduction to soft x-ray spectroscopy. **American Journal of Physics**, Melville, v. 28, p. 235-242, 1960.
- 85 MUKHOPADHYAY, A.; JOSHI, N.; CHATTOPADHYAY, K.; DE, G. A facile synthesis of PEG-coated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and their prevention of the reduction of cytochrome c. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 4, n. 1, p. 142-149, 2012.
- 86 ZHAO, H-Z.; DU, Q.; LI, Z-S.; YANG, Q-Z. Mechanisms for the direct electron transfer of cytochrome c induced by multi-walled carbon nanotubes. **Sensors (Switzerland)**, Basel, v. 12, n. 8, p. 10450-10462, 2012.
- 87 COWAN, J. A.; GRAY, H. B. Q-band splitting in the spectra of heme proteins. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 28, n. 25, p. 4554-4556, 1989.
- 88 SIMON, M.; MEUTH, V. M-L.; CHEVANCE, S.; DELALANDE, O.; BONDON, A. Versatility of non-native forms of human cytochrome c: pH and micellar concentration dependence. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Berlin, v.18, p. 27-38, 2013.

- 89 MILOREY, B.; SCHWITZER-STENNER, R.; KURBAJ, R.; MALYSHKA, D. pH-induced switch between different modes of cytochrome c binding to cardiolipin-containing liposomes. **ACS Omega**, Washington, v. 4, n. 1, p. 1386-1400, 2019.
- 90 KHARE, N.; EGGLESTON, C. M.; LOVELACE, D. M.; BOESE, S. W. Structural and redox properties of mitochondrial cytochrome c co-sorbed with phosphate on hematite (α -hematite) surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 303, n.2, p. 404-414, 2006.
- 91 GEREMIA, S.; GARAU, G.; VACCARI, L.; SGARRA, R.; VIEZZOLI, M. S.; CALLIGARIS, M.; RANDACCIO, L. Cleavage of the iron-methionine bond in c-type cytochromes: crystal structure of oxidized and reduced cytochrome c₂ *Rhodopseudomonas palustris* and its ammonia complex. **Protein Science**, New York, v. 11, n. 1, p. 6-17, 2002.
- 92 MARA, M. W.; HADT, R. G.; REINHARD, M. E.; KROLL, T.; LIM, H.; HARTSOCK, R. W.; ALONSO-MORI, R.; CHOLLET, M.; GLOWNIA, J. M.; NELSON, S.; SOKARAS, D.; KUNNUS K.; HODGSON, K. O.; HEDMAN, B.; BERGMANN, U.; GAFFNEY, K. J.; SOLOMON, E. I. Metalloprotein entatic control ligand-metal bonds quantified by ultrafast x-ray spectroscopy. **Science**, Washington, v. 356, n. 6344, p. 1276-1280, 2017.
- 93 BERGHUIS, A. M.; BRAYER, G. D. Oxidation state-dependent conformational changes in cytochrome c. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 223, n. 4, p. 959-976, 1992.
- 94 MURPHY, M. E. P.; NALL, B. T.; BRAYER, G. D. Structure determination and analysis of yeast iso-2-cytochrome c and a composite mutant protein. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 227, n. 1, p. 160-176, 1992.
- 95 NANTES, I. L.; ZUCCHI, M. R.; NASCIMENTO, O. R.; FALJONI-ALARIO, A. Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome c and its association with membrane interfaces. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 276, n. 5, p. 153-158, 2001.
- 96 KAMINSKY, L. S.; BYRNE, M. J.; DAVISON, A. J. Iron ligands in different forms of ferricytochrome c: the 620 nm band as a probe. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 150, n. 2, p. 355-361, 1972.
- 97 CREUTZ, C.; SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome c by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and remote pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 6, p. 1701-1703, 1973.
- 98 WILTING, J.; BRAAMS, R.; NAUTA, H.; BUUREN, K. J. H. The reduction mechanism of ferricytochrome c. **Biochimica et Biophysica Acta – bioenergetics**, Amsterdam, v. 283, n. 3, p. 543-547, 1972.
- 99 LIU, J.; PEARCE, C. I.; LIU, C.; WANG, Z.; SHI, L.; ARENHOLZ, E.; ROSSO, K. M. $\text{Fe}_{3-x}\text{Ti}_x\text{O}_4$ nanoparticles as tunable probes of microbial metal oxidation. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 135, n. 24, p. 8896-8907, 2013.
- 100 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.
- 101 PEREIRA, A. R.; LUZ, R. A.; LIMA, F. C. D. A.; CRESPILO, F. N. Protein oligomerization based on bronsted acid reaction. **ACS Catalysis**, Washington, v. 7, n. 4, p. 3082-3088, 2017.

- 102 PISHKAR, L.; TAHERI, S.; MAKAREM, S.; ZEINABAD, H. A.; RAHIMI, A.; SABOURY, A. A.; FALAHATI, M. Studies on the interaction between nanodiamond and human hemoglobin by surface tension measurement and spectroscopy methods. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, Abingdon, v. 55, n. 93, p. 14074-14077, 2019.
- 103 OUYANG, X.; WANG, S. Y.; LIU, T.; REN, Y. A.; WANG, M. F.; CHEN, F. F.; WANG, L. L. Functional modulation of cytochrome c upon specific binding to DNA nanoribbons. **Chemical Communications**, London, n. 8, p. 927-934, 2003.
- 104 THOMAS, Y. G.; GOLDBECK, R. A.; KLIGER, D. S. Characterization of equilibrium intermediates in denaturant-induced unfolding of ferrous and ferric cytochromes c using magnetic circular dichroism, circular dichroism, and optical absorption spectroscopies. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, New York, v. 57, n. 1, p. 29-36, 2000.
- 105 MENDEZ, D. L.; BABBITT, S. E.; KING, J. D.; D'ALESSANDRO, J.; WATSON, M. B.; BLANKENSHIP, R. E.; MIRICA, L. M.; KRANZ, R. G. Engineered holocytochrome c synthases that biosynthesize new cytochromes c. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 114, n. 9, p. 2235-2240, 2017.
- 106 GASTEIGER, E. HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *In*: WALKER, J. M. **The proteomics protocols handbook**. Totowa: Humana Press, 2005. 607 p.
- 107 PINHEIRO, T. The interaction of horse heart cytochrome c with phospholipid bilayers. Structural and dynamic effects. **Biochimie**, Amsterdam, v. 76, n. 6, p. 489-500, 1994.
- 108 YU, J.; YANG, L.; LAING, X.; DONG, T.; LIU, H. Bare magnetic nanoparticles as fluorescence quenchers for detection of thrombin. **Analyst**, London, v. 140, n. 12, p. 4114-4120, 2015.
- 109 ESFANDFAR, P.; FALAHATI, M.; SABOURY, A. Spectroscopic studies of interaction between CuO nanoparticles and bovine serum albumin. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, Abingdon, v. 34, n. 9, p. 1962-1968, 2016.
- 110 CHEN, Y-C.; WANG, H-M.; NIU, Q-X.; YE, D-Y.; LIANG, G-W. Binding between saikosaponin c and human serum albumin by fluorescence spectroscopy and molecular docking. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 2, p. 1-13, 2016.
- 111 LIU, Z.; ZHENG, X.; YANG, X.; WANG, E.; WANG, J. Affinity and specificity of levamlodipine-human serum albumin interactions: insights into its carrier function. **Biophysical Journal**, Amsterdam, v. 96, n. 10, p. 3917-3925, 2009.
- 112 BUTLER, J. Kinetics and mechanism of the reduction of ferricytochrome c by the superoxide anion. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 257, n. 18, p. 10747-10750, 1982.
- 113 MYER, Y. P.; THALLAM, K. K.; PANDE, A. Kinetics of the reduction of horse heart ferricytochrome c. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 255, n. 23, p. 9666-9673, 1980.
- 114 MYER, Y. P.; KUMAR, S. Ascorbate reduction of horse heart cytochrome c. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 259, n. 13, p. 8144-8150, 1984.

- 115 LIU, J.; WANG, Z.; BELCHIK, S. M.; EDWARDS, M. J.; LIU, C.; KENNEDY, D. W.; MERKLEY, E. D.; LIPTON, M. S.; BUTT, J. N.; RICHARDSON, D. J.; ZACHARA, J. M.; FREDRICKSON, J. K.; ROSSO, K. M.; SHI, L. Identification and characterization of MtoA: a decaheme c-type cytochrome of the neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 1-11, 2012.
- 116 BÁGEL'OVÁ J.; ANTALÍK, M.; TOMORI, Z. Effect of polyglutamate on the thermal stability of ferricytochrome c. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Madison, v. 43, n. 4, p. 891-900, 1997.
- 117 PETTIGREW, G. W.; MOORE, G. R. **Cytochromes c: biological aspects**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. 282 p.
- 118 YU, C-A.; CHIANG, Y-L.; YU, L.; KING, T. E. Photoreduction of cytochrome c₁. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 250, n. 16, p. 6218-6221, 1975.
- 119 COVIAN, R.; TRUMPOWER, B. L. The rate-limiting step in the cytochrome bc₁ complex (ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase) is not changed by inhibition of cytochrome b-dependent deprotonation. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 284, n. 21, p. 14359-14367, 2009.
- 120 VINCENT, J. F. V.; BOGATYREVA, O. A.; BOGATYREV, N. R.; BOWYER, A.; PAHL, A-K. Biomimetics: its practice and theory. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 3, n. 9, p. 471-482, 2006.
- 121 LEE, C.; LEE, S-Y. Hemin-bound cysteinyl bolaamphiphile self-assembly as a horseradish peroxidase-mimetic catalyst. **RSC Advances**, London, v. 7, n. 62, p. 38989-38997, 2017.
- 122 SHUAI, L.; PAN, X. Hydrolysis of cellulose by cellulase-mimetic solid catalyst. **Energy & Environmental Science**, London, v. 5, n. 5, p. 6889-6894, 2012.
- 123 PIXTON, D. A.; PETERSEN, C. A.; FRANKE, A.; ELDIK, R.; GARTON, E. M.; ANDREW, C. R. Activation parameters for heme-NO binding in *Alcaligenes xylosoxidans* cytochrome c: the putative dinitrosyl intermediate forms via a dissociative mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 131, n. 13, p. 4846-4853, 2009.
- 124 ESPENSON, J. H. **Chemical kinetics and reaction mechanisms**. 2 ed. New York: McGraw-Hill Education, 2002. 296 p.
- 125 PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, London, v. 24, n. 1-2, p. 1-52, 2004.
- 126 DU, X.; LI, X.; XIA, Y-L.; AI, S-M.; LIANG, K.; SANG, P.; JI, X-L.; LIU, S-Q. Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 2, p. 1-34, 2016.
- 127 PANG, S. C.; CHIN, S. F.; ANDERSON, M. A. Redox equilibria of iron oxides in aqueous-based magnetite dispersions: effect of pH and redox potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 311, n. 1, p. 94-101, 2007.
- 128 MACYK, J.; ELDIK, R. Kinetics of the reduction of cytochrome c by [Fe^{II}(edta)(H₂O)]²⁻: outer-sphere vs. inner-sphere electron transfer mechanisms. **Dalton Transactions**, London, v. 3, n. 13, p. 2704-2709, 2003.

- 129 TAVKER, S.; KUMAR, P. Isosbestic point: an application for aerosol spectrometry. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v. 102, n. D25, p. 30017-30022, 1997.
- 130 ROLDÁN-CARMONA, C.; GINER-CASARES, J. J.; PÉREZ-MORALES, M.; MARTÍN-ROMERO, M.; CAMACHO, L. Revisiting the Brewster angle microscopy: the relevance of the polar headgroup. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v.173, 12-22, 2012.
- 131 VOLLHARDT, D. Brewster angle microscopy: a preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Amsterdam, v. 19, n. 3, 183-197, 2014.
- 132 STEFANIU, C.; BREZESINSKI, G.; MOHWALD, H. Polymer-capped magnetite nanoparticles change the 2D structure of DPPC model membranes. **Soft Matter**, London, v. 8, n. 30, 7952-7959, 2012.
- 133 MENDELSON, R.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectrometry of monolayer films at the air-water interface. *In*: GRIFFITHS, P.; CHALMERS, J. M. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, New York: John Wiley & Sons, 2006. 3742 p.
- 134 MENDELSON, R.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectrometry: principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1798, n. 4, p. 788-800, 2010.
- 135 GOTO, T. E.; LOPES, C. C.; NADER, H. B.; SILVA, A. A.; DANTAS, N. O.; SIQUEIRA, J. R.; CASELI, L. CdSe magic-sized quantum dots incorporated in biomembrane models at the air-water interface composed of components of tumorigenic and non-tumorigenic cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1858, n. 7, p. 1533-1540, 2016.
- 136 PEREIRA, L. S. A.; CAMACHO, S. A.; Malfatti-Gasperini, A. A.; JOHELAVICIUS, K.; NOBRE, T. M.; OLIVEIRA, O. N.; AOKI, P. H. B. Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing Eosin Y. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 171, p. 682-689, 2018.
- 137 ZAWISZA, I.; WITTSTOCK, G.; BOUKHERROUB, R.; SZUNERITS, S. Polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy investigations of thin silica films deposited on gold. 2. Structural analysis of a 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine bilayer. **Langmuir**, Washington, v. 24, n. 8, p. 3922-3929, 2008.
- 138 LEVIN, I. W. Two types of hydrocarbon chain interdigitation in sphingomyelin bilayers. **Biochemistry**, Washington, v. 24, n. 22, p. 6282-6286, 1985.
- 139 FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.
- 140 LUZ, R. A. S.; CRESPILO, F. N. Gold Nanoparticle-mediated electron transfer of cytochrome c on a self-assembled surface. **RSC Advances**, London, v. 6, n. 67, p. 62585-62593, 2016.
- 141 LEBÈGUE, E.; LOURO, R. O.; BARRIÈRE, F. Electrochemical detection of pH-responsive grafted catechol and immobilized cytochrome c onto lipid deposit-modified glassy carbon surface. **ACS Omega**, Washington, v. 3, n. 8, p. 9035-9042, 2018.

ANEXO

Publicações em Periódicos

1. **Modenez, I. A.**; Macedo, L. J. A.; Melo, A. F. A. A.; Pereira, A. R.; Oliveira, O. N.; Crespilho, F. N. Nanosized non-proteinaceous complexes III and IV mimicking electron transfer of mitochondrial respiratory chain. Submetido, 2020;
2. Perbone, J. C.; Hassan, A.; Macedo, L. J. A.; Sedenho, G. C.; **Modenez, I. A.**; Crespilho, F. N. In situ and *operando* techniques for investigation of electron transfer reactions on biological systems. Submetido, 2020.

Apresentações em Congressos

1. **Modenez, I. A.**; Melo, A. F. A. A.; Crespilho, F. N. Spontaneous electron transfer between ferricytochrome c and iron oxides nanoparticles as a biomimetic of the respiratory chain. XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Ribeirão Preto – SP, 2019.