UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

VALÉRIA SPOLON MARANGONI

**ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS
CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO CONJUGADAS COM
BIOMOLÉCULAS: SÍNTESE E APLICAÇÕES EM NANOMEDICINA**

São Carlos

2012

VALÉRIA SPOLON MARANGONI

ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE OURO CONJUGADAS COM BIOMOLÉCULAS:
SÍNTESE E APLICAÇÕES EM NANOMEDICINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marangoni, Valéria Spolon

Estudo e desenvolvimento de nanocompósitos
contendo nanopartículas de ouro conjugadas com
biomoléculas: síntese e aplicações em nanomedicina /
Valéria Spolon Marangoni; orientador Valtencir
Zucolotto - versão corrigida -- São Carlos, 2012.
116 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Nanobiocompósitos. 2. Nanopartículas de ouro. 3.
Jacalina. 4. BeCenl. I. Zucolotto, Valtencir,
orient. II. Título.

*Aos meus pais, Adenir e Márcia, e ao meu
irmão, Bruno, por estarem sempre ao meu
lado e me apoiarem em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adenir e Márcia, que são base de toda a minha formação pessoal e profissional. Obrigada pela confiança e apoio em todos os momentos!

Ao meu irmão, Bruno, por tantos anos de convivência, amizade e pelas aulas de Mecânica Quântica.

Ao Pedro, por todo apoio e amizade e a toda sua família, pelo apoio e por compartilharem comigo as dificuldades e conquistas durante todo este período.

Ao Prof. Valtencir Zucolotto pelo grande aprendizado que me proporcionou em todos estes anos de convivência. Obrigada pela amizade e confiança!

À Fapesp pela bolsa de mestrado e todo apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (Laboratório Nacional de Nanotecnologia - LNNano) pela oportunidade de treinamento e utilização do Microscópio Eletrônico de Transmissão. Em especial, gostaria de agradecer a Marina Magnani por todas as sessões de treinamento, paciência e grande ajuda com tudo.

À pró-reitoria de pós-graduação por ter concedido todos os recursos financeiros necessários para a participação e apresentação do trabalho no evento E-MRS 2011 - SPRING MEETING IUMRS ICAM 2011 & E-MRS na cidade de Nice, França.

À diretoria do Instituto de Física de São Carlos - IFSC, pela concessão do prêmio “Yvonne Primerano Mascarenhas” pelo melhor trabalho de Mestrado na I Semana Integrada de Graduação e Pós-Graduação do IFSC.

Aos docentes e funcionários do Grupo de Biofísica Molecular “Sergio Marcarenhas”, em especial, a Andressa e Bel, pela grande ajuda com os experimentos e por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável e organizado para a realização dos experimentos.

À Dra. Ana Isabel de Camargo pela colaboração com a proteína BeCen1 e pelo grande ensinamento na área biológica, principalmente na expressão e purificação de proteínas.

À Ieda, pela imensa ajuda com os experimentos de cultura celular e pelo grande ensinamento nesta área.

À Ester, secretária do Grupo de Biofísica Molecular, e aos funcionários da biblioteca e da pós-graduação do IFSC que sempre nos auxiliam.

Aos amigos do Grupo de Biofísica e do LNN: Paty, Ana Eliza, Ju Cancino, Lilian, Joci, Sussu, Thalita, Zé, Luis, Débora, Julio, Ana Isabel, Andressa, Fernando, Amanda, Jaciara, Camilo, Wagner, Verônica, Fabrício, Denise, Fabio, Edson, Crusca, Thaty, Helton, Ju, Rodrigo, Leandro, Marília. Não tenho palavras para descrever o quanto vocês foram

importantes nestes anos. Obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração no café, Brotas, Churrascos, Cachorro-quente, PQ, congressos, passeios, discussões científicas, conselhos. Enfim, obrigada por estarem presentes e compartilharem comigo as conquistas e dificuldades! Vocês são grandes amigos que eu espero que estejam sempre presentes na minha vida!

Aos amigos da graduação da turma de 2009, que passaram estes últimos anos de mestrado dizendo que eu entrei no “buraco negro” da física. Obrigada pela amizade e compreensão, principalmente: Bruno, Thiago, Lívia, Eder, Naty, Sheyla, Scheila, Alexandre, Ashino, Jesus, Herbert, Gi, Fer, Elys...

Aos amigos desde “pequeninha” que sempre estiveram presentes e me apoiaram: Raisa, Larissa, Gustavo, Jéssica, Renata, Tata.

Ao Instituto de Física de São Carlos pela estrutura, corpo de docentes e funcionários que juntos proporcionaram auxílio na realização desta obra.

Enfim, muito obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus!

*“You have got to find what you love (...)
Your work is going to fill a large part of your life, and
the only way to be truly satisfied is to do what you believe is great work.
And the only way to do great work is to love what you do.
If you haven't found it yet, keep looking. Don't settle.”*

Steve Jobs (Stanford, 2005)

RESUMO

MARANGONI, V.S. **Estudo e desenvolvimento de nanocompósitos contendo nanopartículas de ouro conjugadas com biomoléculas: síntese e aplicações em nanomedicina.** 2012. 116p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A convergência entre a biotecnologia e a nanotecnologia tem levado ao desenvolvimento de novos nanobiocompósitos híbridos com funções sinérgicas que incorporam as propriedades de reconhecimento dos biomateriais com as propriedades eletrônicas, ópticas e catalíticas únicas das nanopartículas. Apesar do recente desenvolvimento na síntese de nanobiocompósitos, a aplicação biomédica destes materiais ainda apresenta muitos desafios, já que não apenas uma conjugação apropriada é requerida, mas também outros importantes aspectos relacionados à biocompatibilidade. O presente trabalho tem como objetivo expandir o campo da síntese e caracterização de nanopartículas funcionalizadas com biomoléculas. Em especial, visamos o entendimento e caracterização das interações entre nanopartículas de ouro (AuNPs) e proteínas, por meio do estudo de dois sistemas distintos: AuNPs funcionalizadas com Jacalina, e AuNPs funcionalizadas com a proteína BeCen1. No primeiro sistema, o interesse advém da capacidade da lectina Jacalina de reconhecer o dissacarídeo (Galβ1-3GalNAc) associado a tumores. Neste caso, AuNPs formadas na presença do dendrímero poli(amidoamina) geração 4.0 (PAMAM G4) foram conjugadas com a Jacalina marcada com o fluóroforo Isotiocianato de fluoresceína (FITC). A formação do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina foi confirmada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Espectroscopia de Absorção no UV-VIS e vibracional (FTIR). A interação entre as AuNP-PAMAM G4 e a Jacalina parece ser um processo dirigido por entropia com afinidade moderada e formação de complexo, segundo os resultados de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) e supressão da fluorescência. Os resultados de Dicroísmo Circular (CD) mostraram que a conjugação da Jacalina com as AuNP-PAMAM G4 não alterou sua estrutura secundária. Testes realizados em cultura de células revelaram que o complexo apresenta maior afinidade e citotoxicidade pelas células de carcinoma do colo de útero humano (HeLa) se comparadas com fibroblastos saudáveis de adipócitos de camundongo (L929). Estes resultados são relevantes uma vez que demonstram o potencial do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC para aplicações biomédicas incluindo diagnóstico e tratamento de câncer. O segundo sistema é interessante devido a habilidade da proteína BeCen1 em formar filamentos nanométricos em função da temperatura. As AuNPs foram formadas na presença da proteína utilizando ácido fórmico diluído como agente redutor e o excesso de proteína foi separado por Cromatografia de Exclusão Molecular. Análises de CD revelaram uma pequena diminuição no conteúdo de α -hélices, confirmado por FTIR, o que pode estar relacionado à interação das AuNPs com os grupamentos amida desta proteína. Medidas de espalhamento de luz revelaram um aumento da turbidez da suspensão do complexo AuNP-BeCen1 com o aumento da temperatura e imagens de TEM, com e sem aquecimento, confirmaram uma mudança de padrão no arranjo das AuNPs. Estes resultados revelam a possibilidade de fabricação de nanobiocompósitos termorresponsivos, o que pode ser muito importante para aplicações em nanodispositivos.

Palavras-chave: Nanobiocompósitos. Nanopartículas de ouro. Jacalina. BeCen1.

ABSTRACT

MARANGONI, V.S. **Study and development of nanocomposites containing gold nanoparticles and biomolecules: synthesis and application in nanomedicine.** 2012. 116p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The convergence between biotechnology and nanotechnology has led to the development of new hybrid nanocomposites that conjugate the bio-recognition properties of biomaterials and the unique electronic, optic and catalytic properties of the nanoparticles. Despite the recent advances in the development of nanobiocomposites, the biomedical applications of these materials are still limited, among other factors, by the low efficiency of functionalization and biocompatibility. The present study was aimed at developing protein-conjugated nanoparticles for application in nanomedicine. Our main focus were the understanding and characterization of the interactions between proteins and gold nanoparticles (AuNPs), which was accomplished using two distinct systems, viz.: Jacalin-functionalized AuNPs, and Becen1-functionalized AuNPs. In the former, the interest is due the capability of the protein Jacalin of recognize the disaccharide (Gal β 1-3GalNAc), largely expressed in some tumors cells. AuNPs were synthesized in the presence of the polyamido amine generation 4.0 (PAMAM G4) and conjugated with a Jacalin target with the fluorescein isothiocyanate (FITC). The excess of protein was removed by centrifugation and the complex formation was confirmed by Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS), UV-VIS Absorption and Vibrational Spectroscopy (FTIR). The interactions between AuNP-PAMAM G4 and Jacalin seemed to be driven by an entropic process with moderate affinity and complex formation, as revealed by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and quenching fluorescence measurements. Furthermore, Circular Dichroism (CD) analyses revealed that protein maintained its secondary structure upon conjugation with the nanoparticles. *In vitro* tests revealed that the AuNPs/Jacalin complexes presented higher affinity and cytotoxicity against human cervical cancer cell (HeLa) compared to healthy mouse fibroblasts (L929). These results are relevant, since the AuNP-PAMAM G4/Jacalin-FITC complex may be used for biomedical applications including cancer treatment and diagnostics. The second nanocomplex, comprising AuNPs and BeCen1, was chosen due to the ability of BeCen 1 to polymerize in the form of nanometric filaments as a function of temperature. The AuNPs were formed in the presence of the protein using diluted formic acid as reducing agent and the excess of protein was removed by Molecular Exclusion Chromatography. CD analysis showed a decrease in the α -helix structures confirmed by FTIR, which may be related to the interaction between the AuNPs and the amide groups of the protein. Light scattering measurements revealed an increase in the turbidity of the dispersions upon increasing the temperature, indicating a change in the arrangement of the AuNPs. Such BeCen-1 induced alignment was confirmed by TEM images. The latter results point to the possibility of fabrication of novel thermoresponsive nanobiocomposites, which are of great relevance for nanodevices applications.

Keywords: Nanobiocomposites. Gold nanoparticles. Jacalin. BeCen1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da variação de densidades de estados em função do tamanho do material. Adaptado de (21).	28
Figura 2 -	Representação esquemática da estabilização de partículas pelo efeito a) eletrostático e b) estérico	29
Figura 3 -	Estrutura molecular do dendrímero PAMAM G4 (38)	33
Figura 4 -	Representação esquemática de uma nanopartícula “teranóstica”. Nanopartículas multifuncionais são direcionadas até a membrana de células cancerígenas usando um ligante específico para um receptor na superfície da célula (51)	36
Figura 5 -	Estrutura tetramérica da Jacalina extraída do pdb (código 1KU8).....	37
Figura 6 -	Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão da proteína BeCen1 contrastada com acetato de uranila mostrando a formação de filamentos após aquecimento (67).....	39
Figura 7 -	Representação esquemática da síntese de nanopartículas de ouro na presença do dendrímero PAMAM G mostrando a estabilização das nanopartículas nas cavidades do dendrímero	46
Figura 8 -	a) TEM da amostra de AuNPs-PAMAM G4 e b) Histograma de tamanho de partícula e distribuição Gaussiana ajustada aos dados indicando um diâmetro médio de $6,1 \pm 0,2$ nm.	61
Figura 9 -	a) Espectro de absorção das AuNPs-PAMAM G4 em diferentes concentrações e b) valores de absorção máxima na banda de ressonância plasmonica de superfície em função da concentração e ajuste linear dos dados.....	63
Figura 10 -	Espectros de absorção no UV-VIS para AuNP-PAMAM G4, Jacalina e AuNP-PAMAM G4/Jacalina.....	65
Figura 11 -	Espectro de absorção para a Jacalina-FITC e AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC.	66
Figura 12 -	Histogramas obtidos a partir de medidas de DLS para as amostras de a) Jacalina, b) AuNP-PAMAM G4 e c) AuNP-PAMAM G4/Jacalina.	68
Figura 13 -	Espectros de CD da Jacalina livre e do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina.	70
Figura 14 -	Espectro de fluorescência da Jacalina e do complexo AuNP-PAMAM	

	G4/Jacalina. O <i>inset</i> do gráfico mostra o espectro para o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC. $\lambda_{\text{excitação}} = 280 \text{ nm}$	71
Figura 15 -	a) Supressão da fluorescência da Jacalina na presença de várias concentrações de AuNP-PAMAM G4. $\lambda_{\text{excitação}} = 280 \text{ nm}$; b) Gráfico da intensidade da fluorescência em 325 nm em função da concentração de AuNP-PAMAM G4; c) Gráfico de $F_0/(F_0-F)$ em função de $1 / [\text{AuNP-PAMAM G4}]$, no <i>inset</i> gráfico de F_0/F contra $[\text{AuNP-PAMAM G4}]$ e d) Gráfico F_0-F em função de $[\text{AuNP-PAMAM G4}]$	74
Figura 16 -	Espectroscopia no Infravermelho a) AuNP-PAMAM G4; b) Jacalina e c) AuNP-PAMAM G4/Jacalina..	77
Figura 17 -	Calorimetria de Titulação Isotérmica das AuNP-PAMAM G4 com a Jacalina. O painel superior mostra os calores produzidos em cada titulação das nanopartículas na suspensão da proteína. O painel inferior mostra a área integrada de cada pico. Os dados foram ajustados segundo o modelo de um sítio de ligação (One Sites).	79
Figura 18 -	a) Imagens de Microscopia eletrônica das AuNP-PAMAM G4 antes (<i>inset</i>) e após a conjugação com a Jacalina; b) Representação esquemática do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina.....	82
Figura 19 -	Imagens obtidas com um aumento de 40 vezes das células HeLa e suas respectivas imagens de fluorescência após 24 horas de incubação e lavagem dos poços. a) e b) controle negativo; c) e d) AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; e) e f) Jacalina-FITC $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$	84
Figura 20 -	Imagens obtidas com um aumento de 40 vezes das células L929 e suas respectivas imagens de fluorescência após 24 horas de incubação e lavagem dos poços. a) e b) controle negativo; c) e d) AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; e) e f) Jacalina-FITC $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$	85
Figura 21 -	Viabilidade das células a) HeLa e b) L929 após 24 de incubação com as amostras. Os valores correspondem a média e o desvio padrão obtidos a partir de três experimentos independentes e em triplicata para cada concentração. *diferença significativa com relação ao controle ($p < 0,05$).	87
Figura 22 -	a) Cromatografia de Exclusão Molecular do complexo AuNP-BeCen1 e BeCen1 livre (<i>insert</i>); b) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das frações 16 e 21 mL da cromatografia do conjugado.....	89
Figura 23 -	Espectro de absorção no UV-VIS do volume 21 mL eluído da coluna de cromatografia de exclusão molecular confirmando a formação do complexo BeCen1-AuNP.....	90
Figura 24 -	a) TEM da amostra de AuNP-BeCen1 e b) Histograma de tamanho de partícula e distribuição Gaussiana ajustada aos dados indicando um diâmetro médio de $5,5 \pm 0,1 \text{ nm}$	91

Figura 25 -	Espectro de emissão para BeCen1 e o complexo AuNP-BeCen1	92
Figura 26 -	Espectros de CD da proteína BeCen1 livre e do complexo AuNP-BeCen1.	93
Figura 27 -	Espectroscopia no Infravermelho a) BeCen1 e b) AuNP-BeCen1.....	95
Figura 28 -	Espalhamento da luz a 350 nm como função do tempo após rápida transferência da solução do gelo para uma dada temperatura em tampão Tris pH = 7,0: a) AuNP-BeCen1, b) BeCen1 livre e c) AuNP-PAMAM G4.	97
Figura 29 -	Espalhamento da luz a 350 nm como função do tempo do complexo AuNP-BeCen1 após ter sido submetido a elevadas temperaturas (Figura 27a) e, posteriormente, passar diferentes tempos no gelo	98
Figura 30 -	Imagens de TEM do complexo AuNP-BeCen1 a) antes e b) após o aquecimento	99
Figura 31 -	Representação esquemática do processo de agregação induzida pela temperatura do complexo AuNP-BeCen1.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diâmetro médio obtido a partir dos histogramas de distribuição de tamanho.....	68
Tabela 2 -	Porcentagens da estrutura da Jacalina livre e do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina. Estimativa realizada utilizando o programa CONTINLL (CD/Pro Package) (97).....	70
Tabela 3 -	Potencial zeta obtido para amostras em pH = 7,4.....	75
Tabela 4 -	Bandas e atribuições encontradas no espectro de infravermelho para a AuNP-PAMAM G4, Jacalina e AuNP-PAMAM G4/Jacalina (30, 83).	77
Tabela 5 -	Parâmetros termodinâmicos para a interação das AuNP-PAMAM G4 com a Jacalina obtido a partir do ajuste dos dados utilizando o modelo de um sítio de ligação (One Sites).	79
Tabela 6 -	Porcentagens da estrutura da BeCen1 livre e do complexo AuNP-BeCen1. Estimativa realizada utilizando o programa CONTINLL (CD/Pro Package) (97).....	93
Tabela 7 -	Bandas e atribuições encontradas no espectro de infravermelho para a BeCen1 livre e conjugada com as AuNPs (82).....	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Absorbância
a_n	Coefficiente de Mie
ANOVA	Análise de variância
Antígeno T	Antígeno Thomsen-Friedenreich
AuNPs	Nanopartículas de ouro
b_n	Coefficiente de Mie
BSA	Albumina de soro bovino
C	Concentração
CD	Dicroísmo Circular
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Intensidade de fluorescência da proteína na presença do supressor
F_0	Intensidade de fluorescência da proteína na ausência do supressor
F_∞	Intensidade de fluorescência da proteína saturada com o supressor
f_a	Fração de sítios de fluoróforos acessíveis ao ligante
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier
GFP	Proteína verde fluorescente
HeLa	Células epiteliais de carcinoma cervical humano
HSA	Albumina de soro humano
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
K_a	Constante de afinidade
K_q	Constante de supressão bimolecular
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
K_{SVa}	Constante de Stern-Volmer da fração acessível
ℓ	Caminho ótico
L929	Fibroblastos de adipócitos de camundongo
LB	Meio de cultura Luria Bertani
MTOCs	Centros Organizadores de Microtúbulos

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico
PAMAM G4	Dendrímero poli(amidoamina) Geração 4
PDB	Banco de Dados de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PBS	Tampão fosfato salino
Potencial ζ	Potencial zeta
QSE	Efeitos Quânticos de tamanho
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERS	Espalhamento Raman intensificado por superfície
SPR	Ressonância de Plasmon de Superfície
T	Temperatura
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV-VIS	Espectroscopia no Ultravioleta-Visível
ΔG	Variação da energia molar de Gibbs
ΔH	Variação da entalpia molar
ΔS	Variação da entropia molar
ε	Coefficiente de absortividade molar
ε_m	Função dielétrica
τ_0	Tempo de vida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Nanociência e Nanotecnologia	27
2.1.1 Estabilidade de nanomateriais	29
2.2 Nanopartículas de ouro	30
2.3 Síntese de nanopartículas de ouro	32
2.4 Nanobiotecnologia	33
2.5 Nanopartículas “teranósticas”: materiais multifuncionais para aplicação em nanomedicina	35
2.5.1 Jacalina	36
2.6 Utilização de biomoléculas na auto-organização de nanomateriais	38
2.6.1 BeCen1	39
2.7 Citotoxicidade de nanomateriais	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Materiais	45
4.2 Estudos do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC	45
4.2.1 Síntese de Nanopartículas de ouro estabilizadas em PAMAM-G4	45
4.2.2 Obtenção e purificação da Jacalina	46
4.2.3 Marcação da Jacalina com FITC	47
4.2.4 Conjugação da Jacalina com as AuNP-PAMAM G4	48
4.2.5 Estudos qualitativos da interação do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC com células tumorais e saudáveis	49
4.2.6 Ensaios de citotoxicidade in vitro	50
4.3 Estudos do complexo AuNP-BeCen1	51
4.3.1 Expressão e purificação da centrina BeCen1	51
4.3.2 Síntese in situ das nanopartículas de ouro com BeCen1	52
4.3.3 Monitoramento da polimerização controlada por temperatura por meio de medidas de espalhamento de luz	53
4.4 Técnicas de Caracterização	53
4.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	53

4.4.2 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-VIS).....	54
4.4.3 Espectroscopia de Fluorescência	55
4.4.4 Dicroísmo Circular (CD)	56
4.4.5. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	56
4.4.6 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	57
4.4.7 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	59
4.4.8 Potencial Zeta (ζ).....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 Síntese e caracterização das AuNP-PAMAM G4	61
5.2 Síntese e caracterização do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina.....	64
5.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	66
5.2.2 Dicroísmo Circular (CD)	69
5.2.3 Espectroscopia de Fluorescência	70
5.2.4 Potencial Zeta (ζ).....	75
5.2.5 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).....	75
5.2.6 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	78
5.2.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão	81
5.2.8 Testes qualitativos <i>in vitro</i>	83
5.2.9 Ensaios de citotoxicidade	86
5.3 Síntese e caracterização do complexo AuNP-BeCen1	88
5.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	90
5.3.2 Espectroscopia de Fluorescência	91
5.3.3 Dicroísmo Circular (CD)	92
5.3.4 Espectroscopia vibracional (FTIR)	93
5.3.5 Análise da propriedade termorresponsiva do complexo AuNP-BeCen1	95
6. CONCLUSÕES.....	101
7. PERSPECTIVAS.....	103
REFERÊNCIAS	105

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de nanomateriais híbridos, que incorporam as propriedades de reconhecimento e catalíticas de biomoléculas com as propriedades eletrônicas, óticas e magnéticas únicas exibidas pelas nanopartículas, tem resultado em nanobiocompósitos com elevado impacto em medicina. Suas aplicações vão desde sistemas de liberação controlada de fármacos e marcadores biológicos, até sistemas para detecção e diagnóstico de doenças (1, 2, 3). O crescente interesse na aplicação destes nanocompósitos em medicina tem levado ao surgimento de uma nova área de pesquisa denominada nanomedicina (4).

Em particular, nanopartículas de ouro são interessantes devido às suas propriedades óticas e eletrônicas diferenciadas (1), fazendo com que sejam úteis para diversas aplicações como detecção de analitos (5), biossensores (6), agentes de contraste em imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (7) e raios X (8), veículo para a entrega de moléculas dentro das células (1) e na terapêutica do câncer (9). Para esta última, normalmente, é requerido que as partículas se alojem especificamente na região de interesse. Esta especificidade pode ser alcançada por meio da funcionalização de sua superfície com biomoléculas como proteínas (10), peptídeos (11), aptâmeros (12) e anticorpos específicos (13). Assim, o desenvolvimento de nanobiocompósitos baseados em nanopartículas de ouro tem tido um importante impacto no diagnóstico e tratamento de doenças.

A interação entre nanopartículas e biomoléculas é, em muitos casos, facilitada pela compatibilidade de tamanhos, e pode ocorrer de maneira sinérgica, fazendo com que propriedades melhoradas ou totalmente novas sejam obtidas a partir da escolha e processamento adequado dos materiais. Esta conjugação proporciona, além do aumento da estabilidade do sistema, a introdução de funcionalizações biocompatíveis e interações biológicas adicionais aos nanomateriais. Biomoléculas possuem interações de reconhecimento complementares fortes e específicas, que permitem levar nanopartículas até células de interesse por meio do seu recobrimento com receptores adequados (2).

Outra questão importante é a organização de nanopartículas para a obtenção de estruturas bem definidas que possam ser integradas em dispositivos para aplicações tecnológicas (14). Para isto, nanopartículas podem ser conjugadas com biomoléculas que

possuem propriedades responsivas, permitindo a obtenção de materiais com forma, tamanho, alinhamento e orientação controlados (15, 16).

Apesar do desenvolvimento considerável nesta área, reativamente pouco é conhecido a respeito das interações entre nanopartículas e biomoléculas, o que representa uma questão muito importante em áreas emergentes como nanomedicina e nanotoxicologia. Para o eficiente desenvolvimento destes nanobiocompósitos são necessários tanto o entendimento dos mecanismos de interação que ocorrem entre as biomoléculas e os nanomateriais quanto o controle dos métodos de manipulação utilizados para conjugação e posterior aplicação destes nanobiocompósitos.

O presente trabalho tem como objetivo expandir o campo da síntese e caracterização de nanopartículas funcionalizadas com biomoléculas. Em especial, visamos o entendimento e caracterização das interações entre nanopartículas de ouro e proteínas por meio do estudo de dois sistemas distintos: nanopartículas de ouro funcionalizadas com Jacalina para a fabricação de nanocompósitos específicos para células tumorais, e nanopartículas de ouro funcionalizadas com BeCen1 para a construção de nanobiocompósitos termorresponsivos e auto-organizados. Os novos nanobiocompósitos aqui desenvolvidos podem apresentar aplicações relevantes em “*smart drug delivery*” e estudos de nanotoxicidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanociência e Nanotecnologia

Materiais nanoestruturados têm adquirido cada vez mais importância em diferentes áreas da ciência e tecnologia, onde projetar e controlar propriedades de interesse no nível atômico e molecular é relevante para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades e aplicações fundamentalmente novas (3). Nanociência pode ser definida como o estudo dos fenômenos e manipulação dos materiais nas escalas atômica e molecular, onde as propriedades diferem significativamente daquelas de uma escala maior, e nanotecnologia como o *design*, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas por meio do controle de forma e tamanho na escala nanométrica (17).

Os fundamentos da nanociência e nanotecnologia foram inicialmente propostos pelo físico norte-americano Richard Feynman em uma conferência proferida em 1959 com o título “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”. Nesta palestra, Feynman introduziu a discussão do tema mostrando as possibilidades de miniaturização e terminou com uma exploração do que poderia ser obtido a partir do controle dos materiais, átomo por átomo (3).

A nanociência e a nanotecnologia têm como base dois conceitos para a obtenção de sistemas nanoestruturados: *top-down* (de cima para baixo) e *bottom-up* (de baixo para cima) (18). A primeira abordagem consiste na miniaturização dos materiais e das estruturas da escala microscópica para a escala nanoscópica. Este tipo de abordagem exige o domínio de toda tecnologia da microeletrônica, implicando no aprimoramento de um vasto arsenal de recursos. A segunda se baseia na construção de estruturas e nanomateriais a partir de átomos e moléculas individuais por meio de processos que permitam o controle tridimensional, gerando sistemas cada vez mais complexos (18). Para tal finalidade, podem ser utilizadas estruturas orgânicas e inorgânicas menores, que serviriam como blocos de construção para as nanoestruturas.

As propriedades diferenciadas ou melhoradas dos materiais quando estruturados na escala nanométrica advém de dois fatores principais: efeitos de superfície e quânticos de tamanhos (QSE, do inglês *Quantum Size Effects*) (19). O aumento da razão entre a área

superficial e o volume resulta em um correspondente aumento na reatividade química (3), fazendo com que alguns nanomateriais sejam ótimos para aplicação em catalisadores, aumentando a eficiência em células a combustível e sensores (20), por exemplo. Em tamanhos intermediários entre o molecular e a matéria estendida (*bulk matter*), chamado de nanoescala, estados de energia individuais das moléculas e bandas contínuas dos sólidos estendidos se tornam discretos, e sua separação de energia mostra uma dependência analítica com a dimensão espacial do material (19). Um esquema é mostrado na Figura 1 e representa a transformação dos estados de densidade eletrônica das bandas de valência e condução, em metais e semicondutores, do contínuo para o discreto, conforme a matéria passa de um estado estendido para o atômico (21). Estes efeitos quânticos possuem consequências diretas nas propriedades eletrônicas, óticas e magnéticas destes materiais.

Portanto, não é a estrutura e a composição do material que são novas, mas sim sua forma, tamanho, arranjo ou orientação. Isto é o que produz materiais com novas funções e novas utilidades. Assim, o desafio não consiste somente em fabricar materiais com a composição adequada, mas também com tamanho e forma controlados. Igualmente importante é que estes nanomateriais tenham a superfície, carga e funcionalidade requerida, uma vez que as propriedades de superfície controlam as interações entre estes materiais e o ambiente, determinando suas propriedades.

Figura 1 - Representação esquemática da variação de densidade de estados em função do tamanho do material Adaptado de (21).

2.1.1 Estabilidade de nanomateriais

Uma fase coloidal é termodinamicamente instável quando comparada com uma fase contínua (22). Isto pode ser explicado pela relação entre a variação da energia livre de Gibbs (dG) e a variação na área superficial de uma amostra ($d\sigma$), a temperatura e pressão constantes, que é dada por $dG = \gamma d\sigma$, onde γ é a tensão superficial interfacial (22). G diminui quando há uma diminuição da área superficial do sistema, o que indica uma tendência natural de agregação. Desta maneira, agentes estabilizantes devem ser utilizados de modo a alterarem as propriedades de superfície das nanopartículas, assim como os parâmetros cinéticos de agregação, permitindo a estabilização destes sistemas em suspensões.

A estabilidade de nanomateriais em suspensão aquosa pode ser obtida por dois mecanismos: eletrostático e/ou estérico. A estabilização eletrostática de uma dispersão de nanopartículas é bem descrita pela teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), que prevê que tal estabilidade é determinada pelo balanço entre as forças atrativas de van der Waals e repulsivas eletrostáticas (1). Como resultado, as nanopartículas se mantêm estáveis, sem agregação, se a intensidade da força eletrostática repulsiva for maior que a intensidade da força atrativa de van der Waals (Figura 2a). Em outras palavras, as nanopartículas não apresentam agregação se contem uma densidade de carga suficiente na superfície.

Na estabilização estérica (Figura 2b), camadas de moléculas longas, como polímeros ou tensoativos não iônicos, adsorvidos na superfície da partícula, repelem uns aos outros por repulsão estérica, impedindo a agregação das partículas. Um efeito combinado é obtido por meio da utilização de polieletrólitos, que estabilizam tanto por um mecanismo estérico quanto eletrostático.

Figura 2 - Representação esquemática da estabilização de partículas pelo efeito a) eletrostático e b) estérico.

2.2 Nanopartículas de ouro

Nanopartículas de ouro (AuNPs) possuem propriedades óticas e eletrônicas diferenciadas, fazendo com que sejam interessantes para muitas aplicações (1, 23). Apesar de algumas aplicações similares poderem ser encontradas em diferentes materiais, como *quantum dots*, AuNPs são consideradas relativamente menos tóxicas, devido à maior inércia do ouro (1).

Quando AuNPs absorvem a luz, seus elétrons são excitados. Excitação na frequência de ressonância plasmonica causa uma oscilação coletiva dos elétrons livres (23). Esta frequência de ressonância plasmonica é uma importante característica das AuNPs, e possui comprimentos de onda entre 510 e 530 nm para nanopartículas com diâmetro entre 4 e 50 nm (24). A ligação e proximidade de moléculas na superfície das nanopartículas podem modificar o comprimento de onda de absorção. Este efeito de acoplamento de plasmon pode ser utilizado para a detecção colorimétrica de analitos (5), medidas de distâncias e mudanças conformacionais das moléculas (25, 26).

Após a absorção da energia proveniente da radiação, os elétrons relaxam e a energia é transferida para a rede cristalina do cristal, gerando calor. O aquecimento das AuNPs é dissipado para o meio circundante (23, 27). Células, e principalmente células anormais, são muito sensíveis a um pequeno aumento da temperatura. Esta propriedade pode ser utilizada no tratamento de câncer em um conceito chamado hipertermia (23). A ideia é que as nanopartículas se acumulem em células tumorais, e com isso, o aquecimento provocado pela radiação possa eliminá-las (28). No entanto, como os tecidos absorvem a radiação no visível, esta técnica ainda é limitada a tecidos próximos a pele (23). Neste caso, o aumento da temperatura em uma região contendo AuNPs pode ser realizado utilizando radiofrequência. Glazer e colaboradores (29) mostraram a destruição de células de adenocarcinoma pancreático tratadas com AuNPs por meio do aquecimento induzido por um campo de radiofrequência.

O espalhamento Raman (30) pode ser melhorado quando as moléculas estão próximas de superfícies de ouro com elevada curvatura como, por exemplo, AuNPs. Este efeito é conhecido como espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS, do inglês *Surface-Enhanced Raman Scattering*) (23). Devido ao significativo aumento do campo, SERS pode ser usado como uma técnica analítica extremamente sensível, excedendo a sensibilidade das

técnicas luminescentes de detecção. Além disso, em experimentos de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*), a sensibilidade pode ser aumentada cerca de 1000 vezes para a detecção de oligonucleotídeos complementares utilizando AuNPs (31).

AuNPs também podem ser utilizadas para a transferência de elétrons em reações redox (1). Neste caso, o objetivo é detectar analitos que são substratos de reações enzimáticas. O fluxo de elétrons desta reação é detectado por alguma medida de corrente. Para este propósito, enzimas são imobilizadas em substratos condutores e conectadas a um amplificador para a detecção da corrente. Uma camada de AuNPs aumenta a rugosidade da superfície, levando ao aumento da corrente (6). Assim, devido ao seu tamanho reduzido e excelentes propriedades óticas e elétricas, sensores baseados em AuNPs têm tido um importante impacto em diagnósticos (26).

Uma das aplicações mais bem exploradas das AuNPs é a sua utilização como veículo para a entrega de moléculas dentro das células (1, 23). Para estas aplicações, as moléculas normalmente são adsorvidas na superfície das nanopartículas. Por exemplo, um gene de DNA pode ser introduzido na célula por adsorção em AuNPs e, conseqüentemente, provocar a expressão de proteínas específicas (32). As células podem captar nanopartículas coloidais por meio de um mecanismo específico, via receptor-ligante, ou não específico. A incorporação específica é mais eficiente, pois, neste caso, as nanopartículas modificadas com os receptores são predominantemente incorporadas pelas células de interesse (23).

AuNPs também são agentes de contraste muito atraentes, pois podem ser visualizadas com uma grande variedade de técnicas. As principais técnicas de detecção são baseadas na interação entre as AuNPs e a luz (23). Por exemplo, devido ao seu elevado peso atômico, AuNPs proporcionam um excelente contraste em imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (7). AuNPs também espalham raios X eficientemente e, desta maneira, proporcionam contraste em imagens de raios X (8).

2.3 Síntese de nanopartículas de ouro

Muitas estratégias têm sido utilizadas no preparo de nanopartículas metálicas, entre elas AuNPs. Em uma síntese típica, sais de ouro são reduzidos pela adição de um agente redutor que leva a nucleação e, conseqüente, crescimento das partículas. No entanto, como descrito anteriormente, um estabilizante é sempre requerido e pode tanto ser adsorvido ou quimicamente ligado à superfície das nanopartículas (23). Na rota mais comum de síntese, as nanopartículas são sintetizadas na presença de ácido cítrico ou citrato de sódio, que atua não só como redutor, mas também fornece estabilidade às nanopartículas devido a sua carga negativa (33).

Rotas de síntese similares também têm sido realizadas em solventes orgânicos (34). Nanopartículas podem ser sintetizadas utilizando redução bifásica (35), onde um sal de metal nobre é dissolvido em água e extraído por transferência de fase em um solvente orgânico seguido por redução. A fabricação das nanopartículas também tem sido realizada por métodos de micela reversa, onde o tamanho e dispersão de tamanho das nanoesferas podem ser controlados por meio da composição da micela (36). Após a síntese, as moléculas estabilizantes podem ser substituídas por outras moléculas em uma reação de troca de ligante. Desta maneira, é possível ajustar as propriedades da superfície das partículas escolhendo as moléculas estabilizantes (23).

Para aplicações biomédicas, as nanopartículas devem ser estáveis em solução aquosa. Dentre os diferentes tipos de moléculas que podem ser utilizadas como estabilizantes, nanopartículas funcionalizadas com polímeros têm emergido como materiais multifuncionais com grande potencial para aplicação em áreas como biossensores, imageamento, dispositivos óticos, entre outros (23). Esta funcionalização permite a obtenção de nanomateriais híbridos orgânico/inorgânico, cujos parâmetros como tamanho, forma, grupos funcionais na superfície podem ser ajustados pela escolha adequada do polímero na superfície (37).

Dentre os polímeros, os dendrímeros, que são macromoléculas com baixa polidispersividade e arquitetura tridimensional regular e altamente ramificada (38, 39), tem sido amplamente utilizados para encapsular ou estabilizar nanopartículas metálicas (40, 41, 42). Uma vez que possuem composição e estrutura bastante definidas, a utilização de dendrímeros permite a reprodutibilidade na fabricação das nanopartículas (40, 41). Além

disso, os grupos terminais dos dendrímeros podem ser adaptados para controlar a solubilidade do nanocompósito e usado para facilitar a ligação com superfícies ou outras moléculas (43). A Figura 3 (38) mostra a estrutura do dendrímero poli(amidoamina) geração 4 (PAMAM G4), utilizado no presente trabalho para a síntese das AuNPs. O número da geração está diretamente relacionado à quantidade de ramificações e, conseqüentemente, de grupos funcionais na superfície dos dendrímeros.

Figura 3 - Estrutura molecular do dendrímero PAMAM G4 (38).

2.4 Nanobiotecnologia

A convergência da biotecnologia e da nanotecnologia tem levado ao desenvolvimento de nanomateriais híbridos que incorporam as propriedades de reconhecimento e catalíticas dos biomateriais, como proteínas e enzimas, com as propriedades eletrônicas e óticas únicas das nanopartículas (2). A funcionalização de nanopartículas com biomoléculas resulta na mudança de suas propriedades e interações com o meio. A solubilidade das nanopartículas em meio aquoso, por exemplo, pode ser melhorada por meio da funcionalização de suas superfícies com biomoléculas altamente hidrofílicas. Desta maneira, modificações da superfície de nanoestruturas utilizando biomoléculas não só fornecem interações biológicas adicionais como também melhoram sua solubilidade e biocompatibilidade (10). Estes novos nanobiocompósitos híbridos com propriedades e funções sinérgicas constituem uma nova área de pesquisa, a nanobiotecnologia (2).

Diversas biomoléculas têm sido conjugadas com nanopartículas. Por exemplo, nanopartículas de ouro conjugadas com oligonucleotídeos são de grande interesse, pois a complementaridade de pares de base do DNA faz com que esses complexos sejam altamente específicos. Esta propriedade pode ser utilizada em biossensores, na detecção de sequências específicas do DNA associadas a anomalias ou doenças (44), bem como para a organização de nanoestruturas supramoleculares (45). Proteínas estão envolvidas em quase todos os processos biológicos e são empregadas em uma ampla gama de formas devido à sua especificidade funcional. Desta maneira, nanoestruturas baseadas em proteínas podem ser a chave para o desenvolvimento de materiais multifuncionais e dispositivos para aplicações biotecnológicas (2).

A conjugação de biomoléculas e nanomateriais tem sido realizada por uma variedade de técnicas que vão desde adsorção eletrostática ou ligação covalente até redução dos metais na presença de biomoléculas (2). A conjugação química de nanopartículas com proteínas envolve a complexação da proteína com nanopartículas modificadas em suspensão. Geralmente, moléculas contendo grupamentos amina ou carboxílico são utilizadas para acoplar as nanopartículas às proteínas (1). Uma opção para a biofuncionalização de AuNPs é por meio da ligação direta da biomolécula na sua superfície. Pequenos peptídeos ou proteínas globulares, por exemplo, têm sido conjugados diretamente na superfície de AuNPs, utilizando grupamentos tióis proveniente do resíduo de aminoácido cisteína (46). DNA modificado com tiol também tem sido diretamente conjugado com AuNPs (32).

É possível observar que a biofuncionalização dos nanomateriais é normalmente realizada por meio da ligação superficial após a fabricação das nanopartículas. Normalmente, várias etapas adicionais de reações e lavagens são requeridas, além da utilização de outros tipos de moléculas funcionalizantes (47). A conjugação *in situ* das nanopartículas tem sido uma ótima alternativa para estes casos (47, 48). Nesta metodologia, o conjugado nanopartícula-proteína é sintetizado em uma única etapa e nenhum outro estabilizante ou molécula de entrecruzamento são necessários. A biomolécula funciona também como estabilizante, diminuindo a quantidade de interferentes no meio (48).

Apesar do desenvolvimento de muitas estratégias de bioconjugação, a aplicação biomédica de nanobiocompósitos ainda apresenta muitos desafios, já que não apenas uma conjugação apropriada é requerida, mas também outros importantes aspectos que dizem respeito a biocompatibilidade e especificidade (1). Estes aspectos incluem: prevenção da agregação da nanopartícula no meio biológico, prevenção da adsorção não específica de

biomoléculas na superfície da nanopartícula, especificidade e baixa toxicidade (1). Portanto, a aplicação biomédica de nanobiocompósitos depende tanto das propriedades físico-químicas das nanopartículas quanto da atividade biológica da biomolécula. Entender os processos de preparação e estabilidade destes nanoconjugados é importante para obter sistemas com a reatividade desejada.

2.5 Nanopartículas “teranósticas”: materiais multifuncionais para aplicação em nanomedicina

O crescente interesse da aplicação da nanotecnologia em medicina tem levado ao surgimento de um novo campo chamado nanomedicina (4). Mais recentemente, o termo “teranóstico” (do inglês “*theranostic*”, consiste na união das palavras *therapeutic* e *diagnostic*) tem sido utilizado para descrever agentes multifuncionais que combinam capacidades terapêuticas e de diagnóstico (49). Esta lógica surgiu do fato de que algumas doenças, como câncer, são imensamente heterogêneas e os tratamentos existentes são limitados e efetivos em apenas alguns estágios da doença. A ideia, portanto, consiste no desenvolvimento de complexos versáteis a partir do casamento entre diagnóstico e terapêutica (9).

Nanovetores multifuncionais específicos para células cancerígenas têm se mostrado excelentes candidatos para o tratamento e diagnóstico de câncer e, por isso, o termo “teranóstico” tem sido amplamente aplicado a nanomateriais. No entanto, a utilização eficiente de nanomateriais para o diagnóstico e tratamento de câncer requer que estas partículas se alojem especificamente na região de interesse. Esta especificidade pode ser alcançada por meio da funcionalização de sua superfície com biomoléculas como proteínas (10), peptídeos (11), aptâmeros (12) e anticorpos específicos (13).

Complexos formados por nanopartículas funcionalizadas com moléculas de reconhecimento melhoram a biodistribuição e o direcionamento das nanopartículas até o tumor (1, 23, 49). As nanopartículas, alojadas na região de interesse, podem, então, ser utilizadas para a detecção precoce de câncer por meio de técnicas de imageamento, além de auxiliarem no tratamento, como por hipertermia (23). Ainda, nestes nanocomplexos pode ser adicionado um antitumoral que é direcionado especificamente até a região cancerígena,

diminuindo, assim, os efeitos colaterais deste fármaco (50). A Figura 4 (51) mostra uma representação esquemática de uma nanopartícula “teranóstica” atuando no reconhecimento específico, podendo ser utilizada, portanto, no diagnóstico, e na liberação controlada de fármacos para o tratamento (51).

Figura 4 - Representação esquemática de uma nanopartícula “teranóstica”. Nanopartículas multifuncionais são direcionadas até a membrana de células cancerígenas usando um ligante específico para um receptor na superfície da célula (51).

2.5.1 Jacalina

Lectinas correspondem a uma classe de proteínas que se ligam especificamente a carboidratos (52). Suas principais atividades biológicas estão relacionadas ao reconhecimento celular, interações patógeno-hospedeiro, sinalização, diferenciação celular e resposta imune por meio da ligação a carboidratos específicos contidos na superfície das células (52, 53).

A Jacalina, uma lectina vegetal encontrada na semente da jaca, é um ligante específico para a galactose e para que esta interação ocorra não é necessária a presença de íons metálicos (54). Na sua estrutura existem de 7 a 10% de carboidratos e não contém resíduos de cisteína. A Jacalina possui massa molar de 66000 g mol^{-1} e ponto Isoelétrico (pI) em uma faixa ampla de pH, entre 4 e 8,5, sugerindo a presença de isoformas (54). Possui a forma de um homotetrâmero em pH neutro com cada unidade tendo 16,5 kDa. Bourne e colaboradores (55) mostraram que os cristais obtidos a partir da Jacalina pertencem ao grupo espacial $P2_1$ com dimensões de cela unitária de 5,8 nm, 8,23 nm e 6,29 nm, contendo um tetrâmero de Jacalina por unidade assimétrica. A Figura 5 ilustra sua estrutura tetramérica (PDB 1KU8).

Figura 5 - Estrutura tetramérica da Jacalina extraída do pdb (código 1KU8).

Como a Jacalina é uma lectina tetramétrica e possui quatro sítios de ligação, estabelece uma ponte ligante entre as células, ligando-se a carboidratos presentes na superfície de diferentes células ao mesmo tempo, formando uma rede que se aglutina (54). Além disso, a Jacalina pode ser um estimulante potente e seletivo de funções distintas das células T e apresenta a habilidade de reconhecer especificamente IgA de soro humano. Ela também interage com regiões específicas do CD4 e inibe a infecção de HIV *in vitro* (54).

A Jacalina também tem chamado atenção devido à sua capacidade de reconhecer especificamente os resíduos de galactose e acetilgalactosamina (GalNac) interligados nas posições $\beta 1-3$ (Gal $\beta 1-3$ GalNac), dissacarídeo associado a tumores de origem oncofetal e conhecido como antígeno Thomsen-Friedenreich (antígeno T) (53, 56, 57, 58). Este dissacarídeo é expresso em aproximadamente 90% dos tipos de cânceres humano, incluindo carcinomas humanos como de mama, bexiga, cavidade bucal, próstata, ovário, fígado e estômago (53, 59). Na maioria destes casos, o aumento da expressão deste antígeno está relacionado com a progressão do câncer e processos de metástase (59).

Desta maneira, o desenvolvimento de um complexo contendo Jacalina e nanopartículas apresenta elevado potencial de aplicação em biotecnologia e medicina para atuação no diagnóstico precoce e tratamento de câncer, onde nanopartículas funcionalizadas com esta lectina podem ser carregadas especificamente até células tumorais.

2.6 Utilização de biomoléculas na auto-organização de nanomateriais

A natureza, em um processo de engenharia evolutiva lenta, tem otimizado o planejamento e a síntese de materiais com estruturas impressionantes e cada vez mais versáteis e resistentes. Segundo Geoffrey A. Ozin em seu livro “*Nanochemistry: a chemical approach to nanomaterials*” (19) é razoável que pesquisadores interessados na fabricação de novos materiais aprendam como a natureza tem resolvido problemas que são frequentemente encontrados na ciência e tecnologia. Este sinergismo entre a natureza e a química de materiais tem inspirado o desenvolvimento de materiais com estruturas e propriedades fundamentalmente novas (19).

A fabricação controlada de estruturas em escalas muito reduzidas que vão além dos limites atuais das técnicas de litografia é uma meta tecnológica de grande interesse prático e fundamental (14). Métodos para atingir este objetivo são baseados principalmente na estabilização de nanopartículas por polímeros que respondam a algum estímulo externo como pH (60), luz (61) ou temperatura (62). Estes materiais são chamados de materiais inteligentes (*smart materials*) (63) e possuem pelo menos uma de suas propriedades, como forma ou solubilidade, drasticamente modificada em resposta a algum destes estímulos.

Outra estratégia incorpora o uso de biomoléculas para organizar nanomateriais em padrões predefinidos. A combinação destas moléculas biológicas com nanomateriais inorgânicos funcionais pode levar a muitas organizações com forma, tamanho, alinhamento e orientação controlados (15, 16). Por exemplo, por meio da conjugação de fitas simples de DNA com nanopartículas de ouro, Sharma e colaboradores (16) formaram nanoestruturas tubulares com várias conformações e quiralidades, semelhantes às dos nanotubos de carbono, o que, segundo os autores, pode representar um avanço substancial para aplicações de nanomateriais em dispositivos. O reconhecimento biológico, como antígeno-anticorpo, proteína-substrato, entre outros, também tem sido utilizado para induzir a agregação reversível de nanopartículas inorgânicas (64).

2.6.1 BeCen1

Centrinas são proteínas de aproximadamente 20000 g mol^{-1} e que possuem quatro domínios *EF-hand* de ligação de cálcio usualmente encontradas em Centros Organizadores de Microtubulos (MTOCs, do inglês *Microtubule-organizing centers*) (65). Inicialmente isolada de raízes flageladas na alga verde unicelular *Tetraselmis striata*, homólogos de centrinas foram localizados também em organismos eucariotos como fungos, plantas e animais (65, 66). As centrinas parecem estar envolvidas em diversos processos que vão desde reparação por excisão de nucleotídeos e transdução de sinais em células fotorreceptoras até transporte de RNAm núcleo-citoplasma (65, 66). No entanto, suas funções mais bem caracterizadas são a contração de fibras dependente de cálcio de células flageladas e orientação, localização e separação de corpos basais e duplicação de MTOCs, essencial para a mitose (66).

A centrina utilizada no presente trabalho é chamada de BeCen1 e foi inicialmente isolada do fungo *Blastocladiella emersonii* (66). Atualmente é produzida heterologicamente por *E.coli*. Esta centrina possui a habilidade de formar filamentos nanométricos em função da temperatura (67), podendo apresentar, portanto, um elevado potencial biotecnológico. A Figura 6 (67) mostra uma imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão da proteína BeCen1 utilizando acetato de uranila como agente de contraste, onde é possível identificar a formação dos filamentos após o aquecimento da proteína. Tourbez e colaboradores (65) também analisaram este processo reversível de formação de filamentos na centrina humana HsCen2, que possui 70% de identidade com a BeCen1.

Figura 6 – Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão da proteína BeCen1 contrastada com acetato de uranila mostrando a formação de filamentos após o aquecimento (67).

Devido a esta interessante propriedade, a conjugação de nanopartículas com esta proteína pode ser utilizada como uma estratégia para a produção de nanomateriais auto-organizados com potencial para várias aplicações tecnológicas como a fabricação de nanodispositivos e processos bioanalíticos (60).

2.7 Citotoxicidade de nanomateriais

Nanomateriais possuem elevado potencial para aplicações médicas que vão desde imageamento e diagnóstico até liberação controlada de fármacos e terapêutica (9). Por este motivo, a toxicidade e biocompatibilidade destes nanomateriais devem ser cuidadosamente avaliadas. Uma vez que nanomateriais não são caracterizados apenas pela sua composição química, mas também por suas dimensões físicas especiais, estudos de toxicidade devem ser realizados com ênfase no entendimento das propriedades físico-químicas que resultam nas respostas biológicas adversas (68, 69). Isto significa que a toxicidade, a atividade e interação dos diferentes tipos de nanomateriais necessitam ser rigorosamente testados. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* são uma maneira simples para avaliar a toxicidade básica de um material (70).

A citotoxicidade de AuNPs tem sido descrita na literatura como dependente do tamanho. Por exemplo, Pan e colaboradores (71) mostraram em estudos *in vitro* que nanopartículas de ouro com 1,4 nm de diâmetro provocam morte celular por meio da indução de estresse oxidativo e danos mitocondriais. Outros estudos apontam que nanopartículas de ouro maiores, acima de 3,7 nm, praticamente não apresentam toxicidade (72, 73). Vale ressaltar, no entanto, que essa toxicidade também é fortemente dependente da dose (72).

A estabilidade e biocompatibilidade das AuNPs podem ser melhoradas por meio da funcionalização de sua superfície (69, 73). Esta cobertura das nanopartículas determina suas propriedades físico-químicas, como tamanho total e carga da superfície. Goodman e colaboradores (74) mostraram que a toxicidade de AuNPs é dependente da carga superficial. Assim, a carga é um fator extremamente importante não só na determinação da estabilidade do complexo, mas também na extensão das interações entre a célula e as nanopartículas (69). Além disso, etapas posteriores à síntese, como lavagem dos nanomateriais para retirada de

compostos provenientes da síntese, controle da agregação no meio biológico, e pH, podem ser determinantes para a toxicidade destes materiais (69).

Torna-se claro que a toxidade de nanomateriais é fortemente dependente de diversos fatores como tamanho, forma, concentração e propriedades de superfície. Desta maneira, o controle destes parâmetros e a caracterização detalhada destes materiais são de fundamental importância para a determinação de suas propriedades no meio biológico. Para cada tipo de nanomaterial, a citotoxicidade deve ser cuidadosamente avaliada e entendida com base nas suas características físico-químicas. Este conhecimento é importante não só para entender os seus efeitos adversos, mas também para otimização dos nanomateriais para futuras aplicações biomédicas.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo expandir o campo da síntese e caracterização de AuNPs funcionalizadas com proteínas. Em especial, visamos o entendimento e caracterização das interações entre nanopartículas e biomoléculas com vistas à aplicação em medicina, por meio do estudo de dois sistemas distintos:

- AuNPs funcionalizadas com a proteína Jacalina para a fabricação de nanopartículas “teranósticas” específicas para células tumorais. Este sistema será caracterizado por técnicas microscópicas, espectroscópicas e calorimétricas.
- AuNPs funcionalizadas com a proteína BeCen1 para a construção de nanocompósitos termorresponsivos e auto-organizados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Todos os reagentes foram utilizados como adquiridos. Todas as soluções foram preparadas utilizando água Milli-Q (resistividade = 18,2 MΩ cm). Ácido tetracloaurico HAuCl_4 , ácido fórmico e Isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *Fluorescein Isothiocyanate*) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Dendrimero Poli(amidoamina) geração 4.0 (PAMAM G4) foi adquirido da Dendritech.

Na preparação do tampão PBS (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*) 0,1 mol L⁻¹, NaCl 0,15 mol L⁻¹ pH = 7,4 foram utilizados os seguintes reagentes: Fosfato de potássio monobásico e Fosfato de sódio dibásico 99% adquiridos da Sigma-Aldrich e Cloreto de sódio da J.T.Baker. No preparo do tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 7,4 também foram utilizados os Fosfato de potássio monobásico e Fosfato de sódio dibásico 99% da Sigma-Aldrich. No preparo do tampão Tris (Tris(hidroximetil)aminometano) 20 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹ e Tris 20 mmol L⁻¹, NaCl 10 mmol L⁻¹, ambos em pH = 7,0, utilizou-se TRIZMAR® Base da Aldrich e Cloreto de sódio da J.T.Baker.

4.2 Estudos do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC

4.2.1 Síntese de Nanopartículas de ouro estabilizadas em PAMAM-G4

Nanopartículas de ouro foram obtidas na presença do dendrímero PAMAM-G4 (AuNP-PAMAM G4). A redução de íons metálicos na presença de dendrímeros pode levar a obtenção de nanopartículas encapsuladas nas cavidades do dendrímero, levando a formação de nanopartículas muito pequenas (menores que 5 nm) e com elevado controle de forma e tamanho (40) como mostra o esquema da Figura 7. Neste caso, as nanopartículas normalmente são obtidas por meio da redução rápida usando NaBH_4 . Por outro lado, a

utilização de redutores mais fracos pode levar a obtenção de nanopartículas maiores, que não são formadas nas cavidades e são estabilizadas por várias moléculas de dendrímeros (75).

A síntese das nanopartículas consistiu basicamente em se adicionar volumes iguais de HAuCl_4 1,0 mmol L^{-1} e PAMAM G4 0,07 mmol L^{-1} e, em seguida, de uma solução de ácido fórmico 10% v/v (76). A geração 4 (Figura 4) foi escolhida no presente trabalho, pois possibilita a obtenção de partículas com tamanhos reduzidos e altamente estáveis em meio aquoso (77). O sistema foi mantido em agitação a temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, permaneceu em repouso e protegido da luz. Quando todo o ouro foi reduzido, a coloração passou de amarelo claro a vermelho. Esta reação ocorreu durante um período total de 4 horas.

Figura 7 - Representação esquemática da síntese de nanopartículas de ouro na presença do dendrímero PAMAM G4 mostrando a estabilização das nanopartículas nas cavidades do dendrímero.

Antes de serem utilizadas, as nanopartículas foram lavadas em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} pH = 7,4. Este tampão foi escolhido, após a realização de vários testes de estabilidade, inclusive na presença da proteína Jacalina. Para isto, as AuNP-PAMAM G4 foram centrifugadas a 13000 rpm e 20°C por 15 minutos em uma Centrifuga Eppendorf 5415 R. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido no tampão. Este ciclo de lavagem foi repetido até que as nanopartículas apresentassem um pH fisiológico. No entanto, devido a instabilidade das AuNP-PAMAM G4 em pH = 7,4, estas lavagens eram realizadas pouco tempo antes de serem utilizadas.

4.2.2 Obtenção e purificação da Jacalina

A lectina Jacalina foi obtida a partir do extrato bruto das sementes de *Artocarpus integrifolia* em colaboração com técnicos do Grupo de Biofísica Molecular – IFSC/USP. As

sementes foram lavadas com água destilada, secas a temperatura ambiente e, então, trituradas e ressuspensas em tampão PBS pH = 7,4. Esta mistura permaneceu em agitação por 12 horas a 4°C e, então, foi centrifugada a 4000 rpm em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R a 4°C. O sobrenadante, ou extrato bruto, foi separado e purificado por cromatografia de afinidade utilizando-se uma resina Sepharose contendo D-Galactose imobilizada (Pierce) equilibrada com o tampão PBS. Após a passagem do extrato bruto, as proteínas que não possuem afinidade por D-Galactose foram eluídas com tampão PBS e coletadas em tubos de 10 mL até que não se observou mais absorção em 280 nm. A Jacalina foi, então, eluída com tampão PBS contendo 0,2 mol L⁻¹ de D-Galactose.

O eluato proveniente da cromatografia de afinidade passou por uma etapa adicional de purificação utilizando cromatografia de exclusão molecular. Volumes de 1 mL da proteína foram aplicados em uma coluna Superdex75 3.2/30 (Pharmacia Biotech Smart System) acoplada a um sistema Äkta purifier (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão PBS pH 7,4. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL min⁻¹, monitorado pela absorbância em 220 e 280 nm. A concentração da proteína foi medida por meio da Lei de Beer-Lambert (Equação 2), utilizando a absorbância em 280 nm e o coeficiente de absorvidade molar desta proteína.

4.2.3 Marcação da Jacalina com FITC

A Jacalina foi marcada com o fluoróforo FITC, cujos comprimentos de onda máximos de excitação e emissão são aproximadamente 495 e 521 nm, respectivamente. O FITC se liga aos grupamentos amino terminal ou aminas primárias das proteínas e, portanto, não deve interferir na conjugação da proteína com as AuNP-PAMAM G4, uma vez que estas últimas são funcionalizadas com grupamentos amina e devem interagir com outros grupamentos da proteína. Esta marcação permitiu o monitoramento por microscopia de fluorescência da proteína e da proteína conjugada com as AuNP-PAMAM G4 nos testes posteriores realizados em cultura de células.

Para a marcação, uma solução de FITC 0,01 mol.L⁻¹ em tampão PBS pH = 7,4 foi adicionada a suspensão de Jacalina 1,0 mg mL⁻¹. O sistema foi mantido em agitação e protegido da luz a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, o excesso de FITC foi removido por diálise no mesmo tampão em uma membrana de 25 kDa (Spectra/Por). A

proteína marcada Jacalina-FITC foi, então, retirada do saco de diálise e conjugada com as AuNP-PAMAM G4.

4.2.4 Conjugação da Jacalina com as AuNP-PAMAM G4

Várias estratégias foram testadas para a conjugação da Jacalina com nanopartículas de ouro. Na redução *in situ*, por exemplo, a proteína mostrou-se instável, precipitando logo após o término da síntese. A interação com nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato também não se mostrou eficiente, visto que a quantidade de proteína junto com as nanopartículas após o processo de separação era muito baixa. Assim, a conjugação com as AuNP-PAMAM G4 foi a que apresentou os melhores resultados e escolhida para as caracterizações posteriores.

Desta maneira, 250 μL de AuNP-PAMAM G4 dispersas em tampão fosfato pH = 7,4 foram adicionados a 1,3 mL de uma solução contendo 1,0 mg mL^{-1} de Jacalina também em tampão PBS. O sistema foi mantido sob agitação a 4 °C e protegido da luz por aproximadamente 12 horas. Tempos maiores de incubação testados não alteraram os resultados espectroscópicos e, portanto, este período foi adotado para todos os experimentos.

A separação do excesso de Jacalina, ou seja, que não foi eficientemente conjugada com as AuNP-PAMAM G4, foi realizada por centrifugação. A amostra foi centrifugada a 13000 rpm e 4 °C por 15 minutos em uma Centrifuga Eppendorf 5415 R. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 500 μL de tampão fosfato 10 mmol L^{-1} pH = 7,4. Este ciclo de lavagem foi repetido por mais duas vezes, para garantir que todo o excesso de proteína fosse eliminado. A separação do excesso de proteína foi testada também por Cromatografia de Exclusão Molecular. No entanto, como as colunas de exclusão molecular eram compostas por agarose e dextran, a Jacalina interagiu fortemente com estas resinas, obtendo-se um baixo rendimento (resultados não mostrados).

4.2.5 Estudos qualitativos da interação do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC com células tumorais e saudáveis

Com o intuito de investigar a especificidade do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC por células tumorais, análises qualitativas acerca da interação do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC com células tumorais e saudáveis foram realizados. Todos os reagentes utilizados na cultura de células foram previamente autoclavados ou filtrados em membrana para evitar a contaminação da cultura. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar com material estéril. Duas linhagens celulares foram testadas: células epiteliais de carcinoma cervical humano (HeLa) e não tumorais de fibroblastos de adipócitos de camundongo (L929), ambas aderentes.

As células (1×10^5 células mL^{-1}) foram incubadas em meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's modified Eagle's medium*), contendo 2% de L-glutamina, suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF), $0,06 \text{ g L}^{-1}$ de penicilina G e $0,10 \text{ g L}^{-1}$ de estreptomicina em estufa com atmosfera de aproximadamente 5% de CO_2 e 37°C . O crescimento celular foi acompanhado utilizando-se o microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100.

As células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços com volume final de $500 \mu\text{L}$ e, após 24 horas, foram tratadas em triplicata com as concentrações de 0,5; 1,0 e $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} $\text{pH} = 7,4$ e deixadas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e 37°C por, aproximadamente, 24 horas. Com o intuito de realizar uma análise comparativa, as mesmas concentrações e condições foram utilizadas para Jacalina-FITC e AuNP-PAMAM G4. O controle negativo foi realizado por meio da adição de quantidades equivalentes do tampão. Para todas as amostras e cada uma das concentrações, os tratamentos foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e as células aderidas foram lavadas três vezes com tampão PBS $\text{pH} = 7,4$ estéril. Em seguida, as imagens foram obtidas em um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TS 100 acoplado a câmera digital Nikon DS-Ri1 com objetiva de 40x. Para cada região fotografada por microscopia ótica, sua respectiva imagem por microscopia de fluorescência era obtida utilizando a excitação no azul correspondente ao comprimento de onda de absorção do FITC.

4.2.6 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

O conhecimento da toxicidade de novos materiais é de fundamental importância para futuras aplicações. Desta maneira, com intuito de avaliar a toxicidade do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC, ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados utilizando as mesmas linhagens celulares, HeLa e L929, e o mesmo procedimento para o cultivo das células. As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços com volume final de 200 μL e, após 24 horas, foram tratadas em triplicata com as concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC, da Jacalina-FITC e AuNP-PAMAM G4 em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} pH = 7,4 e deixadas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e 37 °C por aproximadamente 24 horas. O controle negativo foi realizado por meio da adição de quantidades equivalentes do tampão.

Tanto no experimento qualitativo descrito anteriormente (Tópico 4.2.5) como no teste de toxicidade, o cálculo da concentração do complexo foi baseado na concentração da proteína obtida pela absorção em 280 nm. No controle com a Jacalina-FITC, as mesmas concentrações de proteína foram utilizadas. Já para as AuNP-PAMAM G4, um procedimento análogo ao utilizado para a síntese do complexo foi realizado, mas apenas em tampão, ou seja, na ausência de proteína, para garantir que a quantidade de nanopartículas fosse a mesma. Então, a mesma quantidade adicionada de complexo para cada concentração, foi também adicionada de AuNP-PAMAM G4 em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} .

A citotoxicidade foi analisada utilizando o ensaio MTT, um teste utilizado para avaliar a viabilidade celular baseado em uma reação colorimétrica. O sal brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT, do inglês *3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide*) entra na mitocôndria de uma célula viável e é clivado pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais formazan, de coloração roxa (78). A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular.

Desta maneira, após o período de 24 horas de interação das células com as amostras, 10 μL da solução MTT a 5 mg mL^{-1} em tampão PBS pH = 7,4 foi adicionado a cada poço. As placas foram, então, novamente incubadas na estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e 37 °C por 3 horas. Em seguida, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm em uma

centrifuga Eppendorf 5804R utilizando um rotor de placas. O sobrenadante foi descartado e 100 μ L de DMSO (Dimetilsulfóxido) adicionado em todos os poços para a solubilização dos cristais. Após 5 minutos de agitação em baixa velocidade, a absorbância de cada poço foi determinada utilizando um leitor de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices) a 570 nm.

A porcentagem relativa de células sobreviventes foi calculada dividindo-se a absorbância das células tratadas por aquela do controle de cada experimento. Para todas as amostras e cada uma das concentrações, os tratamentos das células foram realizados em triplicata e para cada tipo de célula os experimentos foram repetidos três vezes, resultando em nove medidas para cada concentração. Os resultados foram analisados de acordo com a média $\pm$ desvio padrão resultante destas nove medidas, e foram estatisticamente comparados utilizando a análise de variância simples (ANOVA) e o teste de comparações múltiplas Tukey no *software* GraphPad Prisma ($p < 0,05$).

4.3 Estudos do complexo AuNP-BeCen1

4.3.1 Expressão e purificação da centrina BeCen1

A expressão e purificação da proteína BeCen1 foram realizadas em colaboração com a Dra. Ana Isabel de Camargo. Brevemente, 5 mL de pré-inóculo em meio LB (Meio de cultura Luria Bertani), contendo o antibiótico canamicina 50 μ g mL⁻¹ para a construção em vetor pET28a desta proteína, foi incubado a 37°C e agitação de 250 rpm durante 16 horas. Após este período, foi diluído em 500 mL de meio LB previamente autoclavado com 50 μ g mL⁻¹ de canamicina e permaneceu em agitação constante de 250 rpm por 2 horas a 37 °C. A cultura foi induzida com 0,4 mmol L⁻¹ de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) a 37 °C e agitação de 250 rpm por mais 4 horas.

Em seguida, a cultura foi centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 10 mL do tampão Tris 20 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹, pH = 7,0 e, então, sonicadas por 10 minutos com intervalos de 30 segundos. Os lisados foram centrifugados por 30 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna de Ni-NTA super flow (Qiagen)

equilibrada com 10 volumes do tampão Tris 20 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹, pH = 7,0. O sobrenadante foi aplicado na coluna, que foi, então, lavada com 10 volumes do tampão contendo quantidades crescentes de imidazol de 5 a 100 mmol L⁻¹ para retirar os contaminantes ligados a coluna com baixa afinidade. Finalmente, a BeCen1 foi eluída em 300 mmol L⁻¹ de imidazol. Este último eluato foi novamente purificado por Cromatografia de Exclusão Molecular em uma coluna Superdex 75 10/300 GL com faixa de separação entre 3000 e 70000 Da, utilizando um sistema AKTA purifier (Amersham, Pharmacia). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Tris 20 mmol L⁻¹, NaCl 10 mmol L⁻¹ pH= 7,0 contendo 1 mmol L⁻¹ de EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) para retirar o Ca²⁺. A velocidade de fluxo foi de 0,5 mL min⁻¹, monitorada pela absorbância em 220 e 280 nm e o eluato coletado em frações de 1 mL. As frações contendo a proteína foram lavadas em um concentrador utilizando o tampão Tris 20 mmol L⁻¹, NaCl 10 mmol L⁻¹ pH= 7,0 para retirar o EDTA.

4.3.2 Síntese *in situ* das nanopartículas de ouro com BeCen1

Na conjugação da proteína BeCen1 com AuNPs, a estratégia que apresentou os melhores resultados foi a síntese *in situ* das nanopartículas, ou seja, a redução dos íons de ouro na presença da proteína BeCen1. Em 700 µL de uma solução da proteína a 0,8 mg mL⁻¹ em tampão Tris 20 mmol L⁻¹, NaCl 10 mmol L⁻¹ pH= 7,0, adicionou-se 100 µL de uma solução de HAuCl₄ 3,0x10⁻⁴ mol L⁻¹. Este sistema foi mantido em agitação por alguns minutos e, então, 30 µL de ácido fórmico 10% v/v foram adicionados. O ácido fórmico atua como redutor e a proteína como estabilizante, sendo determinante na forma e tamanho final das partículas. Após a adição do agente redutor, o sistema foi mantido em agitação a temperatura ambiente por 15 minutos e, então, armazenado a 4 °C e protegido da luz por aproximadamente 24 horas. Após este período, a suspensão apresentou uma coloração rosa.

O excesso de proteína foi removido utilizando-se a técnica de Cromatografia de Exclusão Molecular em uma coluna Superdex 75 10/300 GL, utilizando um sistema AKTA purifier (Amersham, Pharmacia). Esta técnica tem sido muito utilizada no estudo e separação de nanopartículas conjugadas com biomoléculas (79). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Tris 20 mmol L⁻¹, NaCl 10 mmol L⁻¹ pH= 7,0. A velocidade de fluxo foi de 0,5 mL min⁻¹, monitorada pela absorbância em 280 e 520 nm, correspondentes a proteína e as AuNPs,

respectivamente, e o eluato coletado em frações de 1 mL. Apesar de o pH inicial da síntese ser ácido, devido a diluição e troca de tampão na passagem pela coluna, a fração coletada contendo as AuNPs e a proteína apresentaram um pH próximo ao fisiológico.

As frações que apresentaram as bandas em 280 e/ou 520 nm foram submetidas a Eletroforese desnaturante em Gel de Poliacrilamida 15% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando os seguintes marcadores de massa molecular: 12 kDa (citocromo C), 20 kDa (inibidor de tripsina de soja), 29 kDa (anidrase carbônica bovina), 45 kDa (ovalbumina) e 66 kDa (albumina sérica bovina).

4.3.3 Monitoramento da polimerização controlada por temperatura por meio de medidas de espalhamento de luz

A mudança na turbidez induzida pelo rápido aumento da temperatura das suspensões contendo Becen1 e o complexo AuNP-BeCen1 foram monitoradas pela observação do espalhamento de luz a 90° utilizando o Espectrofluorímetro K2 (ISS – Illinois, USA) pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular – IFSC/USP acoplado a um controlador de temperatura NESLAB RET – 111. Para isto, fixou-se o comprimento de onda de excitação e emissão em 350 nm e mediu-se o espalhamento por 1200 segundos em temperaturas fixas de 25, 35, 45 e 55 °C.

4.4 Técnicas de Caracterização

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Uma das maneiras mais eficientes e diretas de caracterizar a morfologia e tamanho de nanopartículas é por meio de imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*). As imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico JEOL JEM-2100 operando a 200 kV, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (Laboratório Nacional de Nanotecnologia) em Campinas-SP. Em todos os casos, os sistemas foram preparados depositando uma gota da suspensão aquosa de

nanopartículas sobre uma grade de cobre recoberta por um filme fino de carbono 300 mesh (Ted Pella, Inc.). Após a deposição da gota sobre o suporte, a água foi lentamente evaporada a temperatura ambiente.

Apenas para o caso em que a intenção era analisar a propriedade de polimerização controlada por temperatura da proteína no complexo AuNP-BeCen1, este sistema foi aquecido a aproximadamente 45 °C durante 15 minutos e, então, uma gota foi depositada sobre a grade de cobre e seca em estufa a 40 °C.

O diâmetro médio e o desvio-padrão das nanopartículas foram determinados estatisticamente pela contagem de 100 a 150 partículas utilizando o *software* de domínio publico ImageJ desenvolvido pelo *National Institute of Health*, NIH, Estados Unidos.

4.4.2 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-VIS)

A espectroscopia no UV-VIS tem sido amplamente utilizada na caracterização das propriedades óticas de nanopartículas metálicas. Segundo a teoria de Mie (80), a quantidade de luz que chega ao detector de um espectrofotômetro, após passar através de uma suspensão diluída de nanopartículas, é uma contribuição da radiação absorvida pela nanopartícula (σ_{abs}) e da radiação espalhada (σ_{sca}), onde a absorbância total é dada por $\sigma = \sigma_{\text{abs}} + \sigma_{\text{sca}}$. A absorbância total está intimamente relacionada com a seção transversal das nanopartículas esféricas, logo σ pode ser calculado em função do tamanho da nanopartícula. Considerando a intensidade de luz absorvida por uma amostra, pode-se escrever:

$$\sigma = \frac{2\pi}{\epsilon_m k_0^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \text{Re}(a_n + b_n) \quad (1)$$

Onde $K_0=2\pi/\lambda$, ϵ_m é a função dielétrica, a_n e b_n são os coeficientes de Mie, que estão relacionados com o tamanho da partícula e a constante dielétrica do meio, e n é a ordem da excitação do multipolo esférico das nanopartículas.

Espectroscopia no UV-VIS também tem sido muito utilizada no monitoramento de moléculas biológicas. Em proteínas, os principais aminoácidos que apresentam transições eletrônicas na região do UV-VIS são triptofano, tirosina e fenilalanina com absorções próximas a 280 nm (81). Esta propriedade tem sido muito útil para a quantificação de

proteínas, uma vez que de acordo com a lei de Beer-Lambert (Equação 2), a absorbância é diretamente proporcional a concentração (81).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

Onde A é a absorbância, ε o coeficiente de absortividade molar, c é a concentração e l o caminho ótico.

Desta maneira, espectroscopia no UV-VIS foi utilizada para identificar e quantificar as nanopartículas de ouro e proteínas bem como observar interações entre elas, uma vez que a ligação entre as proteínas e as nanopartículas pode induzir mudanças ou alargamentos nos espectros de absorção (82). As medidas foram realizadas em um equipamento Hitachi U-2900 pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular – IFSC/USP utilizando cubeta de quartzo previamente limpa com caminho ótico de 1 cm.

4.4.3 Espectroscopia de Fluorescência

O espectro de emissão permite a observação de fenômenos que são diretamente dependentes das características do meio e da estrutura molecular (83). Em proteínas, a fluorescência corresponde a emissão dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina. Assim, o espectro de emissão, bem como deslocamentos, supressão, ou aumento da intensidade de fluorescência destes aminoácidos, estão intimamente relacionados a dinâmica molecular da proteína, sendo importantes para estudos de interações e mudanças conformacionais (82).

Foram realizadas análises comparativas entre os espectros de emissão das proteínas livres e conjugadas com as AuNPs, com o intuito de se identificar interações e modificações conformacionais nas proteínas após a ligação. Experimentos de supressão da fluorescência também foram realizados para o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina e para isto, volumes sucessivos de AuNP-PAMAM G4 foram adicionados a suspensão de Jacalina 0,7 mg mL⁻¹. Em todos os casos, as excitações foram realizadas em um comprimento de onda fixo de 280 nm e fendas de 2 mm e os espectros de emissão foram coletados de 295 a 500 nm em cubetas de quartzo utilizando fendas de 0,5 mm. O Espectrofluorímetro utilizado foi o K2 (ISS – Illinois, USA) pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular – IFSC/USP.

4.4.4 Dicroísmo Circular (CD)

Uma solução de moléculas orientadas aleatoriamente são opticamente ativas se as moléculas forem assimétricas. Sabe-se que, com exceção da glicina, todos os aminoácidos são quirais e, portanto, proteínas apresentam atividade óptica (81). Esta atividade pode ser vista como a diferença na absorção para dois tipos de luz circularmente polarizada (dicroísmo circular). As estruturas secundárias superassimétricas formadas por polipetídeos e proteínas têm espectros de Dicroísmo Circular (CD, do inglês *Circular Dichroism*) característicos (82). Por exemplo, uma banda negativa próxima a 222 nm e uma negativa e positiva acopladas próximas a 208 e 190, respectivamente, são características de estruturas do tipo α -hélice, enquanto uma banda negativa em aproximadamente 215 nm e uma positiva próxima a 198 nm normalmente correspondem a estruturas do tipo folha β (81). Desta maneira, esta técnica tem sido amplamente utilizada para monitorar mudanças conformacionais induzidas pela interação de proteínas com nanopartículas (82).

Os espectros foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco-720 pertencente ao Grupo de Biofísica – IFSC/USP, utilizando-se cubetas de quartzo previamente limpas com caminho óptico de 1 mm. Em todos os casos, os espectros correspondem a média de 15 varreduras.

4.4.5. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A energia potencial envolvida nas transições vibracionais depende da extensão e força da ligação química correspondente. É possível caracterizar um composto por meio de seu espectro vibracional no infravermelho (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), já que as ligações possuem frequências e, portanto, números de onda característicos (81).

FTIR tem se mostrado uma técnica importante na análise de estrutura secundária de proteínas. A maioria das informações de FTIR sobre as estruturas secundárias de proteínas (α -hélice, folhas β ou irregulares) é obtida por meio da análise da banda da amida I que ocorre na região de 1700 a 1600 cm^{-1} (84). Esta banda é devida, principalmente, ao estiramento da

ligação C=O da ligação peptídica e é sensível as diferentes conformações das estruturas secundárias de proteínas (84).

A espectroscopia no Infravermelho também tem sido utilizada para obter informações a respeito da interação entre proteínas e nanopartículas (82). Portanto, FTIR foi empregado com o objetivo de identificar os possíveis grupos moleculares envolvidos na ligação entre as nanopartículas e as proteínas Jacalina e BeCen1. Para isto, as amostras foram liofilizadas em um Savant Speed Vac (SC 200) e misturadas com KBr em uma proporção aproximada de 1:100, respectivamente. Após secagem à vácuo em um dessecador, as amostras foram prensadas, formando pastilhas de 1 cm de diâmetro. As pastilhas eram armazenadas em um dessecador à vácuo antes de cada medida para evitar absorção de água. Os espectros foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Thermo (Nicolet 6700) pertencente ao Grupo de Cristalografia - IFSC/USP, com resolução 4 cm^{-1} , no modo transmitância, no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} e cada espectro foi obtido a partir da média de 100 medidas.

4.4.6 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC, do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*) é uma técnica extremamente poderosa e altamente sensível, capaz de medir os calores de interação de espécies reativas em solução, e tem sido utilizada com sucesso no estudo de interações entre biomoléculas, tanto do ponto de vista termodinâmico quanto cinético (85). Interações entre substratos e inibidores, proteína e proteína, proteína e DNA, proteína e ligantes, proteína e lipídios, proteínas e íons metálicos, fármacos e enzimas e eventos de reconhecimento biomolecular tem sido estudados por ITC (85). Recentemente, alguns estudos têm reportado a aplicação do ITC para investigar a natureza da ligação entre biomoléculas e polímeros com nanopartículas (86, 87, 88). Estes estudos mostram que muitos fatores influenciam nos parâmetros de interação. Por exemplo, dependendo do tamanho e funcionalização das nanopartículas, a interação com um tipo de proteína pode ser endotérmica ou exotérmica e ter constantes de afinidade muito diferentes umas das outras (87, 89, 90).

Além de ser útil no entendimento das interações que ocorrem entre os nanomateriais e biomoléculas durante processos de biofuncionalização, ITC tem sido uma ferramenta importante no estudo da interação das nanopartículas quando administradas *in vivo* ou *in vitro*. Nestes casos, é possível mimetizar o contato de uma partícula com biomoléculas

presentes no meio intra ou extracelular, permitindo uma compreensão detalhada dos efeitos biológicos das nanopartículas como reconhecimento, afinidade e estequiometria com que as biomoléculas se associam com as nanopartículas quando estas são colocadas em um meio biológico (91). Por exemplo, Lindman e colaboradores (89) investigaram a adsorção de albumina de soro humano (HSA, do inglês *Human Serum Albumin*) em nanopartículas poliméricas com diferentes funcionalizações e hidrofobicidade na superfície. Eles mostraram que quanto mais hidrofóbicas as nanopartículas, maior a adsorção de albumina.

Com o intuito de investigar as interações entre a proteína Jacalina e as AuNP-PAMAM-G4, medidas de calorimetria foram realizadas em um microcalorímetro de titulação isotérmica VP-ITC Microcal. Os experimentos foram realizados a 25°C, onde 300 µL de uma suspensão de AuNP-PAMAM-G4, aproximadamente 150 µmol L⁻¹, foram injetados em volumes constantes de 9 µL na cela contendo 1,47 mL da solução de proteína a 30 µmol L⁻¹. Esta condição de titulação foi escolhida, já que a proteína mostrou-se instável em concentrações muito elevadas, que são requeridas para o titulante a fim de se obter a saturação do sistema. A cela de titulação foi agitada continuamente a 255 rpm.

A suspensão de proteína e AuNP-PAMAM-G4 foram dializadas extensivamente contra tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH = 7,4 em membranas de diálise Spectra/Por de 25 kDa. Os tampões de diálise foram trocados até que o pH de ambas estivessem iguais e não houvesse mais alteração. A célula de referência, também com volume de 1,47 mL, foi preenchida com água Milli-Q em todos os experimentos.

Para determinar o calor de diluição, AuNP-PAMAM-G4, no mesmo pH e concentração utilizados nos experimentos, foram tituladas no tampão na ausência da proteína e nas mesmas condições. Estes calores foram, então, descontados das medidas finais. O programa ORIGIN 7 fornecido pela Microcal Inc. foi utilizado para calcular a estequiometria da ligação (N), a constante de afinidade (K_a) e variação da entalpia molar (ΔH) da reação a partir da curva de titulação. A energia molar livre de Gibbs (ΔG) e a entropia (ΔS) da reação foram calculadas a partir dos parâmetros ΔH e K_a determinados experimentalmente.

4.4.7 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) é uma técnica versátil e tem sido amplamente utilizada para medidas *in situ* de distribuição de tamanho de nanopartículas em suspensão (92). Esta técnica é interessante na caracterização de nanopartículas, pois ao contrário de outras técnicas para medida de distribuição de tamanho, como TEM, a amostra não precisa ser seca. Esta secagem da amostra pode provocar mudanças no sistema que pode não refletir com precisão a natureza das espécies em uma dispersão líquida (92). A distribuição de tamanhos das partículas foi obtida por medidas de DLS realizadas a 25°C em triplicata utilizando o equipamento Malvern spectrometer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK) pertencente a Embrapa, São Carlos. Todas as amostras foram medidas em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹.

4.4.8 Potencial Zeta (ζ)

Nanopartículas em suspensão normalmente carregam uma carga eletrostática na sua superfície. Íons ou surfactantes iônicos podem ser adsorvidos na superfície das nanopartículas, modificando o potencial de superfície total e formando uma dupla camada elétrica em torno de cada partícula (82). Esta é constituída de uma camada interna, chamada de camada de Stern, mais fortemente ligada à superfície, e outra camada mais externa que constitui a camada difusa. Quando a partícula se move, os íons dentro deste limite, chamado de superfície de corte hidrodinâmico, movem-se com ela. O potencial desta superfície é designado potencial ζ (82).

O potencial ζ pode ser afetado pelo pH ou força iônica do meio e a interação das partículas se dá pela magnitude do potencial ζ , ou seja, quanto maior o potencial zeta (tanto negativo quanto positivo), maior a estabilização por carga do sistema (82). O potencial ζ das suspensões foi medido a 25°C em triplicata para cada amostra utilizando o equipamento Malvern spectrometer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK) pertencente a Embrapa, São Carlos. Todas as amostras foram medidas em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização das AuNP-PAMAM G4

O desenvolvimento eficiente de nanopartículas para o tratamento e diagnóstico de câncer requer que as partículas se alojem especificamente na região de interesse. Devido a interessante propriedade da Jacalina em reconhecer especificamente alguns tipos de células tumorais (53, 56, 57, 58), nanopartículas de ouro recobertas com esta proteína podem representar importantes avanços nesta área.

Para a conjugação com a Jacalina, nanopartículas de ouro foram sintetizadas na presença do dendrímero PAMAM G4. Uma vez que as propriedades dos nanomateriais são fortemente dependentes de sua forma e tamanho, as AuNP-PAMAM G4, anteriormente a conjugação e sem nenhum tratamento prévio, foram analisadas por TEM (Figura 8), com o intuito de verificarmos o tamanho e a homogeneidade morfológica da amostra.

Figura 8 - a) TEM da amostra de AuNP-PAMAM G4 e b) Histograma de tamanho de partícula e distribuição Gaussiana ajustada aos dados indicando um diâmetro médio de $6,1 \pm 0,2$ nm.

Como pode ser observada na micrografia, a amostra é composta por nanopartículas esféricas com relativa uniformidade de forma e tamanho. O tamanho médio das nanopartículas, bem como a distribuição de tamanho, foi analisado medindo-se

aproximadamente 150 nanopartículas utilizando o *software* ImageJ. O resultado desta análise está representado na Figura 8b, que mostra o histograma de tamanho encontrado e a distribuição Gaussiana ajustada aos dados.

O diâmetro médio e o desvio padrão encontrados por meio do ajuste Gaussiano foi de $6,1 \pm 0,2$ nm e revela que as partículas não são formadas apenas nas cavidades do dendrímero (75). Este fato está de acordo com o esperado uma vez que a redução lenta dos íons metálicos, como foi realizada no presente trabalho, acarreta na formação de estruturas maiores (75), enquanto uma redução extremamente rápida normalmente leva a formação das nanopartículas nas cavidades do dendrímero (40).

Um problema recorrente na área de síntese de nanomateriais é a determinação da concentração molar de nanopartículas em suspensão. O principal problema é que as nanopartículas não são 100% de um único tamanho. Alguns métodos para determinar esta concentração têm sido desenvolvidos utilizando, por exemplo, microbalança de quartzo (93) e espectroscopia no UV-VIS (24).

Uma estratégia utiliza a razão entre o número de átomos total pelo número de átomos que compõe cada nanopartícula para estimar a concentração molar em suspensões de nanopartículas de ouro (94). O número médio de átomos de ouro por nanopartícula pode ser estimado a partir da determinação do diâmetro médio das nanopartículas (D) obtido pelas imagens de TEM. Assumindo uma forma esférica e uma estrutura uniforme do tipo cúbica de face centrada (fcc), o número médio de átomos de ouro (N) para cada nanopartícula pode ser calculado pela Equação 3, onde ρ é a densidade para o ouro fcc ($19,3 \text{ g cm}^{-3}$), M corresponde a massa atômica do ouro (197 g mol^{-1}) e N_A é a constante de Avogadro (94).

$$N = \frac{\pi \rho D^3 N_A}{6 M} \quad (3)$$

A concentração molar (C) da suspensão de nanopartículas de ouro é, então, calculada dividindo-se o número total de átomos de ouro (N_{total}), equivalente a quantidade inicial de ouro adicionada na síntese, pelo número de átomos de ouro por nanopartícula (N) calculado anteriormente, onde V é o volume da solução (94). Assume-se que a redução dos íons de ouro (III) a átomos de ouro seja 100% completa.

$$C = \frac{N_{\text{Total}}}{N V N_A} \quad (4)$$

Estimada a concentração inicial, é importante construir uma curva de calibração para o cálculo de concentrações quando as nanopartículas são lavadas por centrifugação para serem utilizadas em tampão com pH fisiológico. Uma curva de calibração foi construída (Figura 9b) a partir da absorção correspondente ao máximo da banda ressonância plasmonica em diferentes concentrações das suspensões de nanopartículas (Figura 9a). Os dados mostrados na Figura 9b foram ajustados linearmente. O coeficiente de correlação de 0,9994 e o desvio padrão de 0,005 obtidos revelam que nesta faixa de concentração, a absorção da banda de ressonância plasmônica apresenta um comportamento linear com a concentração. A equação da reta ajustada aos dados está mostrada na Figura 9b.

É importante ressaltar que esta concentração é apenas uma estimativa, já que diversas aproximações foram necessárias para a realização dos cálculos. No entanto, é um parâmetro de extrema importância para a padronização das quantidades utilizadas de nanopartículas nos experimentos.

Figura 9 - a) Espectro de absorção das AuNP-PAMAM G4 em diferentes concentrações e b) valores de absorção máxima na banda de ressonância plasmonica de superfície em função da concentração e ajuste linear dos dados.

5.2 Síntese e caracterização do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina

As AuNP-PAMAM G4 foram conjugadas com a Jacalina de acordo com a metodologia descrita no Tópico 4.2.4. O complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina bem como seus precursores foram caracterizados por espectroscopia no UV-VIS (Figura 10). No espectro correspondente as AuNP-PAMAM G4 em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH = 7,4 (linha azul), uma forte banda de absorção é observada em aproximadamente 523 nm e é atribuída às oscilações coletivas do elétrons na superfície das nanopartículas de ouro, chamada de ressonância plasmonica. Este comprimento de onda de absorção está diretamente relacionado com o diâmetro médio das nanopartículas (24). Haiss e colaboradores mostraram esta relação para nanopartículas de ouro de diferentes tamanhos em solução aquosa a partir de dados experimentais e cálculos teóricos (24). Segundo os autores, absorção na região de 520 nm corresponde a nanopartículas com diâmetro de aproximadamente 10 nm, o que está condizente com o tamanho médio obtido para as AuNP-PAMAM G4 por TEM. No espectro da Jacalina, observa-se uma banda em aproximadamente 278 nm, que é devida a absorção dos resíduos de aminoácidos aromáticos da proteína.

No espectro do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina obtido após a separação do excesso de proteína por centrifugação em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, é possível identificar a banda de absorção da proteína e da nanopartícula. Um ligeiro deslocamento para o vermelho, de aproximadamente 3 nm, é observado na banda de absorção da nanopartícula e está associada a modificação de sua superfície devido a conjugação com a proteína. Este resultado é importante uma vez que grandes deslocamentos para maiores comprimentos de onda podem indicar um processo de agregação do sistema (24). A banda de absorção da Jacalina encontra-se consideravelmente alargada, o que pode estar associado a diversos fenômenos, entre eles de que a interação das AuNP-PAMAM G4 com a proteína ocorra em uma região próxima aos resíduos de aminoácidos responsáveis pela absorção nesta proteína (83). No entanto, devido a contribuição de espalhamento das nanopartículas nesta região, é difícil afirmar que esta modificação esteja associada de fato a algum fenômeno específico e, portanto, outros experimentos como Espectroscopia de Fluorescência e ITC foram realizados para entender esta interação.

Figura 10 - Espectros de absorção no UV-VIS para Jacalina, AuNP-PAMAM G4 e AuNP-PAMAM G4/Jacalina.

A funcionalização das AuNP-PAMAM G4 com a proteína proporcionou também maior estabilidade às nanopartículas em pH fisiológico. Após períodos inferiores a 24 horas já se observava o processo de agregação das AuNP-PAMAM G4 suspensas no tampão quando na ausência da proteína. Já o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina mostrou-se estável por períodos de até um mês. No entanto, padronizou-se a utilização do complexo por no máximo duas semanas, para evitar a utilização de proteína não ativa. As amostras eram sempre armazenadas nas mesmas condições (temperatura de 4°C e protegidas da luz). Estas observações levam a conclusão de que a conjugação com a proteína conferiu maior estabilidade às nanopartículas no pH fisiológico, o que é muito importante para aplicações em sistemas biológicos.

A conjugação com FITC foi realizada para permitir a visualização do complexo e da Jacalina, principalmente para os experimentos em cultura celular. A utilização deste fluoróforo também é importante para futuras aplicações deste complexo, pois permite a utilização de técnicas adicionais de detecção, tornando o complexo ainda mais versátil. Para isto, a conjugação da Jacalina com o FITC e, posteriormente, com as nanopartículas, foi monitorada por espectroscopia no UV-VIS (Figura 11). O espectro da Jacalina conjugada com FITC foi obtido após a remoção do excesso de fluoresceína por diálise. Observa-se a absorção da fluoresceína em aproximadamente 490 nm, indicando que a marcação foi eficiente. Após a

conjugação com as AuNP-PAMAM G4 e separação do excesso de proteína, é possível identificar a presença das bandas de absorção características da proteína, do FITC e das AuNPs, indicando que a conjugação foi eficiente.

Figura 11 - Espectro de absorção para a Jacalina-FITC e AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC.

5.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Quando uma suspensão de nanopartículas é colocada em contato com proteínas, elas podem não interagir, formar conjugados, ou este contato pode desencadear um processo de aglomeração. Tsai e colaboradores (95) observaram, por meio de medidas de DLS, uma diminuição do tamanho das partículas quando BSA era adicionado às nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato com tamanho de aproximadamente 10 nm. Segundo os autores, esta diminuição estava associada a grande porcentagem de proteína não ligada na suspensão, que, por serem menor, contribuíam para a diminuição do tamanho médio. A remoção do excesso de proteína por centrifugação levou ao aumento do tamanho médio da partícula comparado com a nanopartícula livre devido à adsorção de proteínas na superfície da partícula (95). Outro estudo, porém, mostrou que a adsorção de BSA em nanopartículas de ouro catiônicas

desencadeou um processo de agregação, resultando em um grande aumento no tamanho médio das partículas, que passou de 10 nm para um diâmetro superior a 100 nm (87).

As distribuições de tamanho para a Jacalina, AuNP-PAMAM G4 e para o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina, obtidas por medidas de DLS, são mostradas na Figura 12, enquanto a Tabela 1 sumariza estes resultados. O diâmetro médio das AuNP-PAMAM G4 foi encontrado como sendo aproximadamente $7,6 \pm 0,3$ nm. Este diâmetro é ligeiramente superior àquele obtido nas análises de TEM e está de acordo com o esperado, uma vez que as medidas de DLS estão relacionadas com o diâmetro hidrodinâmico das partículas (92). O diâmetro encontrado para a Jacalina foi de $5,4 \pm 0,1$ nm e está condizente com os estudos estruturais realizados para esta proteína (55). O complexo formado por AuNP-PAMAM G4 e Jacalina apresentou um diâmetro hidrodinâmico de $19,7 \pm 0,3$ nm. Este aumento observado após a conjugação das Jacalina com as AuNP-PAMAM G4 está relacionado a formação da camada de proteína em torno das nanopartículas, uma vez que não se observou a presença de grandes partículas que normalmente estão associadas a processos de agregação.

Figura 12 - Histogramas obtidos a partir de medidas de DLS para as amostras de a) Jacalina, b) AuNP-PAMAM G4 e c) AuNP-PAMAM G4/Jacalina.

Tabela 1 - Diâmetro médio obtido a partir dos histogramas de distribuição de tamanho.

Amostra	Diâmetro médio / nm
a) Jacalina	$5,4 \pm 0,1$ nm
b) AuNP-PAMAM G4	$7,6 \pm 0,3$ nm
c) AuNP-PAMAM G4/Jacalina	$19,7 \pm 0,3$ nm

5.2.2 Dicroísmo Circular (CD)

A estrutura e o comportamento de proteínas em solução aquosa são governados por múltiplas interações incluindo eletrostática, hidrofóbica, van der Waals e ligação de hidrogênio (81). A conjugação de proteínas na superfície de nanopartículas pode alterar sua estrutura secundária e terciária e, conseqüentemente, sua atividade (82). Uma análise comparativa utilizando a técnica de CD foi realizada com o intuito de se verificar possíveis mudanças na estrutura secundária da Jacalina devido a interação com as AuNP-PAMAM G4.

Como pode ser observada na Figura 13, a Jacalina apresenta um espectro de CD típico de estruturas em folhas beta (96). Este espectro se caracteriza por uma banda positiva em 203 nm e uma banda negativa em torno de 218 nm, sendo este perfil observado tanto na presença quanto ausência das nanopartículas. O cruzamento com a linha positiva ocorre próximo de 210 para ambas. Nanopartículas de ouro não apresentam quiralidade e, portanto, não afetam o espectro de CD da proteína. Entretanto, quando as nanopartículas são grandes, elas podem influenciar a intensidade do sinal, devido ao espalhamento. Por este motivo, o controle contendo apenas AuNP-PAMAM G4 no mesmo tampão foi realizado e descontado do espectro do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina para que os ajustes de concentração pudessem ser realizados.

Para investigar mais profundamente a influência das AuNP-PAMAM G4 na estrutura secundária da Jacalina, realizou-se a deconvolução dos espectros utilizando o programa CONTINLL (CD/Pro Package). Os métodos de deconvolução de espectros estimam as componentes comuns dos espectros experimentais de CD, permitindo a obtenção de suas curvas puras (α -hélice, folhas- β , voltas- β , estruturas desordenadas) e porcentagens que representam no espectro (97). Os resultados estão mostrados na Tabela 2 e revelam que praticamente não houve alteração nas porcentagens de estruturas da proteína, o que demonstra que a Jacalina manteve sua estrutura secundária mesmo após a conjugação com as AuNP-PAMAM G4.

Figura 13 - Espectros de CD da Jacalina livre e do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina.

Tabela 2 - Porcentagens da estrutura da Jacalina livre e do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina.. Estimativa realizada utilizando o programa CONTINLL (CD/Pro Package) (97).

	α -hélice	folha β	voltas	desordenadas
Jacalina	3,7%	42,9%	20,9%	32,5%
AuNP-PAMAM G4/Jacalina	3,5%	41,7%	20,7%	34,1%

5.2.3 Espectroscopia de Fluorescência

As propriedades ópticas de moléculas fluorescentes podem ser afetadas pela proximidade com nanopartículas metálicas, ocasionando um aumento ou supressão da fluorescência, dependendo da distância entre a molécula e a nanopartícula (98). Espectros de fluorescência de estado estacionário foram obtidos para Jacalina livre e conjugada com as AuNP-PAMAM G4, utilizando o comprimento de onda de excitação de 280 nm em ambos os casos.

A Figura 14 mostra os espectros para a Jacalina, AuNP-PAMAM G4/Jacalina e AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC (*inset*), com uma concentração de aproximadamente $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ para a Jacalina em todos os casos. Como pode ser notada, a Jacalina exibe uma

intensa banda de fluorescência centrada em aproximadamente 325 nm, que é devida, principalmente, a emissão dos resíduos de tirosina e triptofano. No espectro da Jacalina conjugada com as AuNP-PAMAM G4, observa-se uma supressão da fluorescência. Este fenômeno pode estar associado tanto a um processo de colisão quanto a formação de um complexo entre o supressor e o fluoróforo (99). Além disso, é possível observar um deslocamento de aproximadamente 4 nm para maiores comprimentos de onda (*red shift*) quando se compara a Jacalina conjugada com a não conjugada. Este *red shift* pode estar relacionado a uma pequena alteração no microambiente dos resíduos de aminoácidos fluorescentes.

O *inset* da Figura 14 mostra o espectro para as AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC, cujos comprimentos de onda máximo de emissão e intensidade de fluorescência são muito parecidos aos do espectro do complexo na ausência do FITC, o que demonstra que a marcação da proteína com a fluoresceína não induziu mudanças adicionais na estrutura da Jacalina.

Figura 14 - Espectro de fluorescência da Jacalina e do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina. O *inset* do gráfico mostra o espectro para o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC. $\lambda_{\text{excitação}} = 280$ nm.

Fenômenos de supressão da fluorescência podem fornecer muitas informações a respeito da interação entre o supressor e o fluoróforo (83). Assim, com o intuito de entender melhor este processo, volumes sucessivos de AuNP-PAMAM G4 foram adicionados a uma

suspensão de Jacalina. Para cada concentração de nanopartículas, três espectros eram obtidos com o intuito de garantir que a queda na intensidade de fluorescência estava relacionada de fato a supressão. Além disso, estes experimentos foram realizados em uma cubeta de quartzo de 3 mL e com agitação magnética, para garantir a homogeneização da suspensão durante a adição das AuNP-PAMAM G4.

A partir dos espectros obtidos (Figura 15a), construiu-se o gráfico mostrado na Figura 15b para a intensidade em 325 nm. O perfil obtido é caracterizado por uma diminuição acentuada da intensidade de fluorescência, seguida de estabilização. Esta estabilização para valores não nulos de intensidades de fluorescência sugere a existência de fluoróforos que não estão acessíveis ou que não interagem com o supressor. A supressão da fluorescência é frequentemente descrita pela equação de Stern-Volmer (Equação 5) (83).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [\text{AuNP PAMAM G4}] = 1 + K_{SV} [\text{AuNP PAMAM G4}] \quad (5)$$

Onde F_0 e F representam as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente. K_{SV} a constante de supressão de Stern-Volmer e $[\text{AuNP-PAMAM G4}]$ a concentração do supressor. K_q é a constante de supressão bimolecular e τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo. A constante K_q pode refletir a eficiência da supressão ou a acessibilidade do fluoróforo ao supressor (83). A supressão pode ter dois mecanismos distintos: um processo dinâmico ou estático. O primeiro resulta, principalmente, de colisões entre o fluoróforo e o supressor e, neste caso, o valor de K_q é limitado a $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Já a supressão estática resulta da formação de complexo entre o supressor e o fluoróforo e apresenta valores de K_q superiores a $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (83).

Quando o gráfico de Stern-Volmer apresenta um comportamento linear tem-se um indicativo de que todos os fluoróforos estão igualmente acessíveis ao supressor (83). No entanto, quando duas ou mais populações de fluoróforos estão presentes, e uma não está igualmente acessível ou não possui a mesma afinidade pelo supressor, normalmente tem-se um desvio da linearidade (83). Como pode ser observado no *inset* da Figura 15c, em concentrações mais elevadas do supressor, o gráfico de Stern-Volmer não apresenta um comportamento linear, indicando a presença de populações distintas de fluoróforos. Este comportamento é lógico, uma vez que a Jacalina possui onze resíduos de tirosina e dois resíduos de triptofano, situados em regiões diferentes da proteína. Neste caso, a avaliação da

fração de fluoróforo acessível ao supressor pode ser realizada utilizando a equação modificada de Stern-Volmer (Equação 6) (83).

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a \times K_{SVa} \times [\text{AuNP-PAMAM G4}]} + \frac{1}{f_a} \quad (6)$$

Onde F e F_0 correspondem à intensidade de emissão da proteína em suspensão na presença e ausência do supressor, respectivamente; f_a é a fração dos sítios de fluoróforos acessíveis ao ligante; $[\text{AuNP-PAMAM G4}]$ é a concentração do supressor e K_{SVa} é a constante de Stern-Volmer da fração acessível.

O gráfico obtido a partir da equação modificada de Stern-Volmer está mostrado na Figura 15c, onde nota-se o comportamento linear dos dados. Esta observação explica o fato de a intensidade de fluorescência não se anular totalmente quando o sistema está saturado (Figura 15b). A partir do ajuste linear dos dados na Figura 15c e da Equação 6, determinou-se f_a como sendo 0,74, o que indica que aproximadamente 74% dos resíduos fluoróforos da proteína encontram-se acessíveis para o supressor, e K_{SVa} como sendo $9,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Este elevado valor da constante de Stern-Volmer sugere que o processo de supressão seja estático, ou seja, com a formação de complexos (99). As supressões estática e dinâmica também podem ser diferenciadas pela dependência distinta com a temperatura e viscosidade e por medidas de tempo de vida (83) e, portanto, estas medidas poderão ser realizadas para entendermos mais profundamente este processo.

A determinação da constante de afinidade (K_a) pode ser realizada utilizando o modelo de Langmuir, assumindo um sítio de ligação, como descrito pela Equação 7 (100). O gráfico obtido está mostrado na Figura 15d.

$$F_0 - F = \frac{(F_0 - F_\infty)[\text{AuNP-PAMAM G4}]}{\frac{1}{K_a} + [\text{AuNP-PAMAM G4}]} \quad (7)$$

Onde F_∞ é a fluorescência quando a proteína quando está saturada com o ligante. A partir do ajuste dos dados utilizando o programa Origin 7.0, determinou-se o valor de $8,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para a constante de afinidade. A constante de Stern-Volmer mostrou-se muito similar a constante de afinidade encontrada, o que está de acordo com o esperado uma vez a constante de Stern-Volmer tem sido sugerida como sendo muito próxima a constante de ligação ou constante de

afinidade (100, 101). Estes resultados foram comparados com parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC.

Figura 15 – a) Supressão da fluorescência da Jacalina na presença de várias concentrações de AuNP-PAMAM G4. $\lambda_{\text{excitação}} = 280 \text{ nm}$; b) Gráfico da intensidade de fluorescência em 325 nm em função da concentração de AuNP-PAMAM G4; c) Gráfico de $F_0/(F_0-F)$ em função de $1 / [\text{AuNP-PAMAM G4}]$, no inset gráfico de F_0/F contra $[\text{AuNP-PAMAM G4}]$ e d) Gráfico F_0-F em função de $[\text{AuNP-PAMAM G4}]$.

5.2.4 Potencial Zeta (ζ)

As medidas de potencial zeta (ζ) estão apresentadas na Tabela 3. O potencial ζ das AuNP-PAMAM G4 em tampão fosfato pH = 7,4 revelou que os grupamentos amina praticamente não estão mais protonados, o que justifica a baixa estabilidade das AuNP-PAMAM G4 neste pH, como mencionado anteriormente. A Jacalina também apresenta um potencial ζ relativamente baixo no pH fisiológico. O potencial ζ para o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina, no entanto, mostrou-se altamente positivo. Como tanto as AuNP-PAMAM G4 sem recobrimento como as que estão com recobrimento estavam no mesmo pH, o aumento no valor do potencial ζ pode estar relacionado a formação de uma camada de proteína em torno das nanopartículas bem como com a modificação de grupos na superfície da proteína e das nanopartículas. Com o intuito de entender melhor esta interação, medidas de Espectroscopia Vibracional (FTIR) e Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) foram realizadas.

Tabela 3 - Potencial ζ obtido para amostras em pH = 7,4.

Amostra	Potencial Zeta / mV
Jacalina	+ 2,28
AuNP-PAMAM G4	+ 0,98
AuNP-PAMAM G4/Jacalina	+ 28,6

5.2.5 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Espectroscopia no infravermelho foi empregada para obter informações acerca das interações entre as AuNP-PAMAM G4 e a Jacalina. Obtiveram-se os espectros de ambas e do complexo após a separação do excesso de proteína. A Figura 16 mostra os espectros sem correção da linha de base. Os espectros estão deslocados no eixo y e normalizados pela concentração para facilitar a análise comparativa.

As principais bandas e atribuições são mostradas na Tabela 4. No espectro das nanopartículas, as bandas observadas são provenientes do estabilizante PAMAM G4. A banda próxima a 3500 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo NH_2 . A forte banda em 1651 e 1594 cm^{-1} caracterizada por um dublete corresponde ao estiramento C=O e deformação N-H /estiramento C-N das amidas do interior do dendrímero (30). Estas bandas podem estar relativamente alteradas com relação ao PAMAM G4 livre devido à presença das nanopartículas de ouro (77).

As principais bandas da Jacalina, assim como de outras proteínas, são os modos vibracionais dos grupamentos amida. A banda amida I é devida principalmente ao estiramento da ligação C=O da ligação peptídica (84). As bandas de amida II e III correspondem à combinação fora de fase e em fase, respectivamente, da deformação angular de N-H e estiramento C-N . A banda próxima a 3500 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação N-H das aminas e O-H de álcool e ácido carboxílico (30).

Analisando os espectros, é possível observar que o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina apresenta as principais bandas pertencentes às AuNP-PAMAM G4 e a Jacalina. A presença destas bandas mesmo após as lavagens do complexo indica que a proteína foi eficientemente conjugada com as nanopartículas. No entanto, uma análise comparativa dos espectros é dificultada devido ao elevado número de modos vibracionais e da ocorrência de sobreposição de bandas. Apesar disto, podemos observar pequenas modificações nas intensidades relativas e deslocamentos de algumas bandas. Se compararmos a intensidade das bandas da Jacalina e das AuNP-PAMAM G4 com as do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina, notamos que as bandas abaixo de 1300 cm^{-1} , provenientes da Jacalina, apresentaram um aumento de intensidade e pequenos deslocamentos. Já a banda da amida I, que se apresenta relativamente maior que as demais no espectro da Jacalina, encontra-se com a mesma intensidade no espectro do complexo. Além disso, a banda intensa em aproximadamente 3500 cm^{-1} da Jacalina aparentemente não é observada no espectro no complexo.

Uma diminuição na intensidade da banda de amida I está normalmente associada a uma redução na porcentagem de estruturas do tipo α -hélices da proteína (102), o que não foi observado nos espectros de CD. As bandas abaixo de 1200 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, principalmente ácido glutâmico, ácido aspártico, serina e tirosina (103). Estas bandas estão relacionadas, principalmente, ao estiramento da ligação C-O e deformação angular no plano e fora do plano

da ligação O-H e são sensíveis ao aumento de interações realizadas por estes grupamentos. Por exemplo, a banda em 620 cm^{-1} é atribuída à deformação da ligação C-OH e o aumento de interações realizadas por este grupo por ligação de hidrogênio, por exemplo, pode acarretar em um alargamento e deslocamento da banda (30), como foi observado no espectro do complexo. O aumento da intensidade e deslocamento para maiores comprimentos de onda das bandas em aproximadamente 1121 e 1065 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento da ligação C-O, principalmente de ácido carboxílico, também indicam um aumento da interação destes grupos (30). Ainda, o aumento de interações dos grupos OH de ácidos carboxílicos e alcoóis provoca um grande alargamento com diminuição da intensidade e deslocamento para menores comprimentos de onda da banda de estiramento OH (30). Assim, esta banda pode estar disfarçada no espectro do complexo pela banda de estiramento da amina, que é menos sensível a interações (30).

Figura 16 - Espectroscopia no Infravermelho a) AuNP-PAMAM G4; b) Jacalina e c) AuNP-PAMAM G4/Jacalina.

Tabela 4 - Bandas e atribuições encontradas no espectro de infravermelho para a AuNP-PAMAM G4, Jacalina e AuNP-PAMAM G4/Jacalina (30, 84).

AuNP-PAMAM G4	Jacalina	AuNP-PAMAMG4/Jacalina
1651 cm^{-1}	1629 cm^{-1} (amida I)	1628 cm^{-1}
1594 cm^{-1}	1549 cm^{-1} (amida II)	-----
-----	$1121/1065\text{ cm}^{-1}$ (amida III)	$1133/1071\text{ cm}^{-1}$

A estrutura primária da Jacalina é composta de aproximadamente 25% de resíduos de ácidos glutâmico e aspártico, tirosina e serina, cujas cadeias laterais são constituídas por grupos funcionais COOH ou OH. Desta maneira, é provável que a interação entre as AuNP-PAMAM G4 e a Jacalina ocorra na direção dos grupamentos OH e, principalmente, COOH desta proteína com os grupos amina provenientes do PAMAM G4. A interação eletrostática não parece ser a mais favorável, de acordo com os valores de potencial ζ , sendo provável que a interação ocorra por ligação de hidrogênio entre as cadeias laterais destes aminoácidos e os grupamentos amina do PAMAM G4. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Espectroscopia de Fluorescência, onde o fenômeno de supressão indica um processo estático, ou seja, com formação de complexo entre os resíduos de aminoácidos fluoróforos, ou regiões muito próximas a eles, e as AuNP-PAMAM G4.

5.2.6 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) tem sido uma técnica cada vez mais utilizada no estudo de interações entre nanomateriais e biomoléculas para a investigação de processos termodinâmicos e estequiométricos (86, 88). ITC foi empregado para avaliar a natureza da interação entre as AuNP-PAMAM G4 e a proteína Jacalina. A Figura 17 mostra os calores produzidos em cada titulação e os dados correspondentes a área integrada de cada pico, que foram ajustados segundo o modelo de um sítio de ligação utilizando o programa Origin 7 fornecido pela Microcal Inc, permitindo a obtenção dos parâmetros termodinâmicos (Tabela 5).

Observando os calores produzidos (painel superior da Figura 17), nota-se que com o progresso das injeções, o número de sítios disponíveis para a ligação diminui continuamente até que a saturação ocorre e é refletida como uma queda monotônica na resposta calorimétrica endotérmica (104). Os valores termodinâmicos mostrados na Tabela 5 revelam que a interação das nanopartícula com a proteína envolve um processo endotérmico ($\Delta H > 0$) que é compensado por uma variação positiva da entropia ($\Delta S > 0$), resultando em uma variação total de energia livre favorável ($\Delta G < 0$).

Figura 17 - Calorimetria de Titulação Isotérmica das AuNP-PAMAM G4 com a Jacalina. O painel superior mostra os calores produzidos em cada titulação das nanoparticulas na suspensão da proteína. O painel inferior mostra a área integrada de cada pico. Os dados foram ajustados segundo o modelo de um sítio de ligação (*One Sites*).

Tabela 5 - Parâmetros termodinâmicos para a interação das AuNP-PAMAM G4 com a Jacalina obtidos a partir do ajuste dos dados utilizando o modelo de um sítio de ligação (*One Sites*).

Parâmetro	Valor
n	9,5
K (M ⁻¹)	5,3 (±0,5) x10 ⁴
ΔH (kJ mol ⁻¹)	83,6 ± 0,7
TΔS (kJ mol ⁻¹)	122,9
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-39,3

De e colaboradores (87) observaram a interação de nanopartículas de ouro com três proteínas diferentes: PhosA (do inglês, *acid phosphatase*), BSA (do inglês, *bovine serum albumin*) e GFP (do inglês, *green fluorescence protein*) que possuem, respectivamente, 110

kDa, 66,3 kDa e 27 kDa. Eles observaram que as ligações de BSA e GFP eram endotérmicas e dirigidas pelo aumento da entropia, enquanto a ligação de PhosA era exotérmica e possuía variação de entropia desfavorável. Este processo controlado por entalpia ou entropia pode ser explicado se considerarmos o processo total descrito na Equação 10, que é uma combinação de dois processos simultâneos (Equações 8 e 9) (87).

Onde $H_2O_{proteína}$, H_2O_{NP} e $H_2O_{Proteína-NP}$ correspondem as moléculas de água associadas às proteínas, as nanopartículas e ao complexo proteína-NP, respectivamente.

O primeiro processo é a formação do complexo não covalente, onde ΔH e ΔS são negativos. A reorganização do solvente (Equação 9) envolve a ruptura da camada bem definida de solvente, resultando em um processo endotérmico. Dependendo da contribuição destes dois processos, a complexação final (Equação 10) poderá ser exotérmica ou endotérmica (87).

Na complexação de proteínas menores, por exemplo, GFP e BSA, o grau de interação com a superfície é maior, o que resulta na liberação de uma grande quantidade de moléculas de água da interface que se liga. Este processo é evidente a partir da grande variação positiva de entropia. Por outro lado, a interação proteína-nanopartícula desempenha o papel principal para PhosA indicado pela variação negativa da entalpia (87).

A Jacalina possui aproximadamente o mesmo tamanho da proteína BSA e, pelos resultados mostrados na Tabela 5, a conjugação com as AuNP-PAMAM G4 também é dirigida por entropia. A estequiometria da ligação foi calculada em aproximadamente 9,5 moléculas de proteína para cada nanopartícula e está de acordo com os resultados obtidos por potencial ζ e TEM, mostrado a seguir, que revelam a formação de uma densa camada de proteína em torno da nanopartícula. É importante ressaltar, no entanto, que para estes cálculos utilizou-se a concentração molar aproximada de nanopartículas de acordo com o Tópico 5.1 e, que, portanto, este resultado é apenas uma estimativa.

O aumento da entropia pode ser justificado pela alta estequiometria da interação. Quanto maior o número de moléculas de proteínas que interagem com cada nanopartícula, maior o processo de dessolvatação e liberação de moléculas de água, levando a um aumento

da entropia. A redução da entropia da proteína que se associa as nanopartículas é mais do que compensada pelo aumento da entropia das moléculas de água, o que resulta em um aumento da entropia total do sistema.

A constante K_a é um parâmetro importante que representa a afinidade entre os compostos, neste caso a proteína Jacalina e as AuNP-PAMAM G4. O valor obtido de K_a é da ordem de 10^4 M^{-1} , similar ao valor obtido nos experimentos de supressão da fluorescência, e revela uma afinidade moderada entre as AuNP-PAMAM G4 e a Jacalina (99).

Os resultados apresentados até o momento sugerem que a interação entre as AuNP-PAMAM G4 ocorra entre as cadeias laterais de aminoácidos como tirosina, serina, triptofano, entre outros, e os grupamentos amina do PAMAM G4 por mecanismos como ligações de hidrogênio. Assim, para que esta interação ocorra, é necessário que estes grupamentos estejam disponíveis para interagir, o que resulta na liberação de uma grande quantidade de moléculas de água de solvatação, ocasionando o aumento da entropia do sistema. O resultado é um processo dirigido por entropia que, como descrito na literatura (79), normalmente não resulta em mudanças drásticas na estrutura da proteína, o que é muito importante para garantir sua atividade.

5.2.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Figura 18a mostra a imagem das nanopartículas antes (*inset*) e após a conjugação com a proteína. Comparada com as nanopartículas antes da funcionalização com a proteína, uma sombra é claramente observada no complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina e representa a camada da proteína na superfície das nanopartículas de ouro. Este fenômeno ocorre devido ao fato de que biopolímeros possuem uma densidade eletrônica bem menor que a de nanopartículas metálicas e, portanto, são menos visíveis por TEM. Estas amostras biológicas são usualmente contrastadas usando sais de metais pesados (*negative/positive stain*) para visualização em TEM (105). Entretanto, como estes filmes formados por proteínas em torno das nanopartículas são normalmente densos, é possível observá-los utilizando microscopia eletrônica de alta resolução sem a utilização de marcadores, permitindo diferenciá-los das nanopartículas apenas pela diferença de contraste do material (105). Esta observação também

foi feita por Nghiem e colaboradores para a funcionalização de nanopartículas de ouro com BSA (10).

A espessura desta camada, de aproximadamente 3,2 nm, é um pouco menor que o valor esperado pelos resultados de DLS. As medidas de DLS estão relacionadas ao raio hidrodinâmico da partícula e, em alguns casos, pode ocorrer uma diferença na espessura da camada de proteína observada devido aos efeitos de secagem, exposição ao alto vácuo e ao feixe de elétrons de elevada energia (106). A partir da estequiometria aproximada calculada por ITC, dos dados de DLS e das imagens de TEM, foi possível esboçar uma representação esquemática do complexo mostrado na Figura 18b.

Figura 18 - a) Imagens de Microscopia eletrônica das AuNP-PAMAM G4 antes (*inset*) e após a conjugação com a Jacalina; b) Representação esquemática do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina.

5.2.8 Testes qualitativos *in vitro*

A Jacalina tem chamado muito atenção devido a sua capacidade de reconhecer especificamente o dissacarídeo (Gal β 1-3GalNAc) associado a alguns tipos de tumores e conhecido como antígeno T (53, 56, 57, 58). A conjugação desta proteína com nanopartículas pode ser importante para aplicações biomédicas como diagnóstico e tratamento de câncer. Por isso, algumas análises utilizando células de carcinoma humano HeLa e fibroblastos saudáveis L929 foram realizadas, com o intuito de desenvolvermos sistemas “teranósticos”.

As imagens de microscopia ótica e de fluorescência para HeLa e L929 após 24 horas de tratamento com as amostras estão mostradas na Figuras 19 e 20, respectivamente. Estas imagens foram obtidas após lavagens dos poços com tampão PBS pH = 7,4 estéril para retirar o excesso de composto não ligado às células. Como era esperado, as células tratadas com AuNP-PAMAM G4 na ausência de Jacalina e do marcador FITC não apresentaram regiões fluorescentes, nem antes, nem após as lavagens, e por isso estas imagens não foram mostradas.

Figura 19 - Imagens obtidas com um aumento de 40 vezes das células HeLa e suas respectivas imagens de fluorescência após 24 horas de incubação e lavagem dos poços. a) e b) controle negativo; c) e d) AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; e) e f) Jacalina-FITC $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 20 - Imagens obtidas com um aumento de 40 vezes das células L929 e suas respectivas imagens de fluorescência após 24 horas de incubação e lavagem dos poços. a) e b) controle negativo; c) e d) AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; e) e f) Jacalina-FITC $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Observando as imagens mostradas na Figura 19c e 19d, nota-se claramente a marcação das células HeLa tratadas com o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC. Nas Figuras 19e e 19f também é possível identificar este fenômeno. As células L929 tratadas com as amostras não se mostraram fluorescentes após a lavagem (Figura 20). Em algumas regiões, foi possível identificar alguns pontos fluorescentes, mas na sobreposição com as respectivas imagens de microscopia ótica, concluía-se que correspondiam a precipitados que não foram eliminados durante as lavagens.

Portanto, a funcionalização das AuNP-PAMAM G4 com a Jacalina-FITC parece ter conferido ao complexo maior afinidade para as células de carcinoma HeLa se comparado com os fibroblastos saudáveis (L929). No entanto, como estas análises são qualitativas, é importante que outros experimentos, como microscopia confocal e citometria de fluxo, sejam realizados com o intuito de confirmar este comportamento.

5.2.9 Ensaios de citotoxicidade

Os resultados apresentados anteriormente demonstram o potencial para aplicações em nanomedicina do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC. No entanto, uma questão importante no desenvolvimento de novos materiais para aplicações nesta área é a avaliação da sua toxicidade. A Figura 21 mostra a viabilidade celular após 24 horas de incubação com as amostras utilizando o ensaio MTT. Em todos os casos, é possível observar que a toxicidade é dependente da quantidade.

A Figura 21a mostra a porcentagem de células HeLa viáveis após o período de incubação com as amostras. É possível notar que o complexo apresentou uma toxicidade maior se comparada com a Jacalina e AuNP-PAMAM G4 separadamente. Para todas as concentrações, o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC apresentou uma diferença significativa com relação ao controle negativo. Comparando com os resultados obtidos para as células saudáveis L929 (Figura 21b), observa-se que apenas as concentrações de 1,0 e 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram consideradas tóxicas, com relação ao controle. Além disso, as células L929 tratadas com o complexo apresentaram maior viabilidade se comparadas com aquelas tratadas com as mesmas concentrações de AuNP-PAMAM G4, na ausência da proteína.

Para as células tratadas com Jacalina-FITC, observa-se uma diminuição mais significativa na viabilidade para a HeLa, se comparada com a L929, principalmente para a concentração de 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Kabir e colaboradores (54) mostraram que a Jacalina inibe a proliferação de células de adenocarcinoma de cólon humano (HT29). Os autores sugerem que esta inibição seja mediada pelo antígeno T, expresso nestas células. Outro estudo recente (107) revela que a frutalina, uma lectina que possui propriedades muito semelhantes e mais de 98% de identidade sequencial com a Jacalina, apresenta efeitos citotóxicos em células HeLa. Assim, estas lectinas vegetais têm sido descritas não apenas como biomoléculas de

reconhecimento para células tumorais, mas também como potenciais agentes anticancerígenos devido à inibição da proliferação e citotoxicidade mostradas para estas células (54, 108).

Ambas as células tratadas com as AuNP-PAMAM G4 apresentaram porcentagens de células viáveis muito próximas para as mesmas concentrações. Isto demonstra que na ausência de recobrimento com moléculas bioativas, estas nanopartículas apresentam a mesma toxicidade para células tumorais e saudáveis. Pan e colaboradores (109) também observaram que para partículas de ouro do mesmo tamanho, nenhuma diferença significativa é observada na toxicidade para células HeLa e L929.

Pode-se, então, inferir que a elevada toxicidade do complexo para as células HeLa deve-se a um efeito combinado da Jacalina e AuNP-PAMAM G4. Já no caso da linhagem celular saudável (L929), como a Jacalina não apresenta afinidade para a ligação nestas células, a funcionalização com a proteína atua apenas como uma camada que confere maior biocompatibilidade às AuNP-PAMAM G4, provavelmente melhorando a estabilidade das nanopartículas no pH fisiológico, como evidenciado pelas medidas de potencial ζ .

Figura 21 - Viabilidade das células a) HeLa e b) L929 após 24 de incubação com as amostras. Os valores correspondem a média e o desvio padrão obtidos a partir de três experimentos independentes e em triplicata para cada concentração. *diferença significativa com relação ao controle ($p < 0,05$).

5.3 Síntese e caracterização do complexo AuNP-BeCen1

Um dos grandes desafios na área de síntese de nanomateriais é a organização de nanopartículas para a obtenção de estruturas bem definidas que possam, por exemplo, ser integradas em dispositivos para aplicações tecnológicas (14). Utilizando nanopartículas conjugadas com materiais inteligentes, pode-se obter nanocomplexos auto-organizados por meio do controle de algum de seus parâmetros físicos, como temperatura (62) ou pH (60). A proteína BeCen1 apresenta uma interessante característica de formar filamentos nanométricos reversíveis em função da temperatura (67) e, por isso, nanopartículas de ouro baseadas nesta proteína podem fornecer importantes avanços no desenvolvimento de nanomateriais auto-organizados.

A conjugação da proteína BeCen1 com AuNPs procedeu-se utilizando uma metodologia de síntese distinta daquela utilizada para a Jacalina. Neste caso, as nanopartículas de ouro foram formadas na presença da proteína (*in situ*), utilizando ácido fórmico diluído como agente redutor na ausência de qualquer outro estabilizante.

A separação do excesso de proteína que não interagiu eficientemente com a nanopartícula foi realizada por Cromatografia por Exclusão Molecular. A Figura 22a mostra o perfil de eluição da proteína livre (*inset*) e conjugada. Ambas foram monitoradas em 280 e 520 nm para que fosse possível identificar a eluição da proteína e das AuNPs, respectivamente. Como pode ser observado, há uma clara diferença entre o perfil de eluição das duas amostras. O complexo AuNP-BeCen1 apresenta, além da absorção em 280 nm no volume de 16 mL, que é muito próximo ao da BeCen1 livre (15 mL), a presença de absorção tanto em 280 nm como em 520 nm na fração de 21 mL. Este resultado sugere que na amostra contendo as nanopartículas e a BeCen1, nem toda proteína tenha interagido eficientemente com as AuNPs e, por isso, houve a saída da proteína em duas frações, o que permitiu, portanto, a separação da proteína livre.

No entanto, era de se esperar que o conjugado, por possuir uma massa molecular maior, fosse eluído em um volume anterior ao volume da proteína livre (110). Este atraso na eluição do complexo está relacionado a interação das AuNPs com a coluna, como já havia sido observado em alguns experimentos anteriores. Apesar disto, o rendimento após a

separação foi satisfatório e superior a outras metodologias de separação utilizadas, como centrifugação.

Para confirmar que a absorção em 280 nm observada nas duas frações (16 e 21 mL) correspondia de fato a BeCen1, uma alíquota de 20 μ L de ambas as frações foi retirada e submetida a Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE). A imagem do gel é mostrada na Figura 22b, onde é possível inferir que a proteína estava presente em ambas as frações. A pequena diminuição no deslocamento da fração 21 mL pode estar relacionada a um relativo aumento na massa, confirmando a formação do complexo AuNP-BeCen1 (111).

Figura 22 - a) Cromatografia de Exclusão Molecular do complexo AuNP-BeCen1 e BeCen1 livre (*insert*); b) Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) das frações 16 e 21 mL da cromatografia do conjugado.

O volume de 21 mL foi separado e utilizado nas análises subsequentes. O espectro de absorção no UV-VIS (Figura 23) revela a presença das bandas de absorção em 280 e 520 nm, atribuídas a ressonância plasmonica de superfície das AuNPs e aos aminoácidos aromáticos presentes na proteína, respectivamente.

Figura 23 - Espectro de absorção no UV-VIS do volume 21 mL eluído da coluna de cromatografia de exclusão molecular confirmando a formação do complexo AuNP-BeCen1.

5.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A caracterização morfológica das AuNP-BeCen1 foi realizada utilizando TEM (Figura 24a). Como pode ser observada na micrografia, a amostra é composta por nanopartículas esféricas. O tamanho médio das nanopartículas bem como a distribuição de tamanho foram analisados medindo-se aproximadamente 250 nanopartículas utilizando o *software* ImageJ. O resultado desta análise está representado na Figura 24b, que mostra o histograma de tamanho encontrado e a distribuição Gaussiana ajustada aos dados. O diâmetro médio e o desvio padrão encontrados por meio do ajuste com a função Gaussiana foi de $5,5 \pm 0,1$ nm.

Figura 24 - a) TEM da amostra de AuNP-BeCen1 e b) Histograma de tamanho de partícula e distribuição Gaussiana ajustada aos dados indicando um diâmetro médio de $5,5 \pm 0,1$ nm.

5.3.2 Espectroscopia de Fluorescência

O espectros de emissão obtidos para BeCen1 livre e conjugada com as AuNPs, com excitação em 280 nm, estão mostrados na Figura 25. Em ambos os casos, a concentração utilizada foi de aproximadamente $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteína. Nota-se que a intensidade de fluorescência da BeCen1 é muito baixa para esta concentração. Isto se deve ao fato de que esta proteína possui apenas um resíduo de tirosina e nenhum de triptofano.

Analogamente ao que se observou para o complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina, houve um deslocamento para maiores comprimentos de onda (*red-shift*), o que pode estar relacionado a uma pequena modificação estrutural na BeCen1, tornando os resíduos de aminoácidos fluoróforos mais expostos. A diminuição da intensidade de fluorescência, menor neste caso, deve estar relacionada a proximidade entre a biomolécula e as AuNPs. No entanto, como a determinação da concentração da proteína era dificultada pela baixa absorção em 280 nm é difícil afirmar que esta pequena diminuição refere-se de fato a um fenômeno de supressão. Além disso, não foi possível obter a curva de Stern-Volmer uma vez que as AuNPs foram sintetizadas na presença da BeCen1.

Figura 25 - Espectro de emissão para BeCen1 e o complexo AuNP-BeCen1.

5.3.3 Dicroísmo Circular (CD)

O efeito das nanopartículas na estrutura secundária da proteína foi avaliado utilizando a técnica de Dicroísmo Circular (CD). A Figura 26 mostra o espectro de CD da BeCen1, onde se identificou um padrão de elipicidade correspondente ao padrão de absorção das α -hélices, em aproximadamente 208 e 222 nm. Este perfil foi observado tanto na BeCen1 livre quanto na conjugada com as AuNPs. Analogamente ao realizado para os espectros de CD da Jacalina, as porcentagens das estruturas na proteína foram estimadas por meio da deconvolução dos espectros utilizando o programa CONTINLL (CD/Pro Package) (97) e são mostradas na Tabela 6.

Os dados revelam uma diminuição na porcentagem de estruturas α -hélices, acompanhada de um aumento de estruturas do tipo folha β e voltas. É possível observar também que praticamente não houve aumento na porcentagem de estruturas desordenadas. Estas modificações podem estar relacionadas com a interação da BeCen1 com as AuNPs. Em trabalhos anteriores realizados no Grupo de Biofísica Molecular - IFSC (67) é mostrado que esta proteína possui estabilidade em uma ampla faixa de pH, mas que em pHs muito extremos pode ocorrer uma pequena diminuição no conteúdo de α -hélice. Apesar de o pH final da

suspensão, após a passagem na coluna, ter um pH próximo ao fisiológico, a formação das nanopartículas em meio ácido também pode ter provocado uma ligeira modificação estrutural na proteína contribuindo para as modificações estruturais.

Figura 26 - Espectros de CD da proteína BeCen1 livre e do complexo AuNP-BeCen1.

Tabela 6 - Porcentagens da estrutura da BeCen1 livre e do complexo AuNP-BeCen1. Estimativa realizada utilizando o programa CONTINLL (CD/Pro Package) (97).

	α -hélice	folha β	voltas	desordenadas
BeCen1	37,1%	11,3%	19,4%	32,2%
AuNP-BeCen1	29,9%	15,1%	22,3%	32,7%

5.3.4 Espectroscopia vibracional (FTIR)

Análises de FTIR foram realizadas para entender o processo de funcionalização e estabilização das nanopartículas de ouro na presença da proteína BeCen1. A Figura 27 mostra os espectros da proteína BeCen1 e do complexo AuNP-BeCen1, onde é possível identificar as principais bandas características de proteínas (Tabela 7). A banda amida I é devida, principalmente, ao estiramento da ligação C=O, enquanto a de amida II e III correspondem a

combinação fora de fase e em fase, respectivamente, da deformação angular de N-H e estiramento C-N. A banda de amida A é devida ao estiramento da ligação N-H (84).

Uma análise comparativa entre os espectros revela diferentes alargamentos e pequenos deslocamentos. Sabe-se que alargamentos ou deslocamentos nas bandas de espectros de FTIR podem estar relacionados com o aumento das interações realizadas por estes grupos (48, 82). Por exemplo, a banda da amida I aparece em 1631 cm^{-1} para a BeCen1 livre e em 1590 cm^{-1} para AuNP-BeCen1, enquanto a banda de amida II aparece em 1403 cm^{-1} para BeCen1 livre e 1351 cm^{-1} para AuNP-BeCen1 (112).

Estas modificações podem indicar uma forte interação entre as AuNPs e os grupamentos amida da proteína. A interação de AuNPs com grupamentos amida e amina também tem sido descrita na literatura para a estabilização de nanopartículas de ouro com alguns polímeros (113). A presença destas interações é o que impede a agregação e possibilita a obtenção de AuNPs monodispersas. Como estas bandas, principalmente a banda da amida I, estão associadas à estrutura secundária da proteína (84), a interação com estes grupos pode estar relacionada às modificações estruturais da proteína observadas por CD.

Esta técnica também tem sido utilizada para investigar a manutenção das ligações peptídicas. Por exemplo, alguns estudos mostram que borohidreto de sódio (NaBH_4) pode destruir as ligações peptídicas (48). Assim, principalmente nos casos em que a síntese é realizada *in situ*, ou seja, na presença da proteína, esta técnica tem se mostrado importante uma vez que a presença dos modos vibracionais dos grupamentos amida é um indicativo de que as ligações peptídicas não foram danificadas (48).

Figura 27 - Espectroscopia no Infravermelho a) BeCen1 e b) AuNP-BeCen1.

Tabela 7 - Bandas e atribuições encontradas no espectro de infravermelho para a BeCen1 livre e conjugada com AuNP (84).

BeCen1	AuNP-BeCen1	Atribuições
1631 cm ⁻¹	1590 cm ⁻¹	Amida I
1403 cm ⁻¹	1351 cm ⁻¹	Amida II
1043 cm ⁻¹	1068 cm ⁻¹	Amida III

5.3.5 Análise da propriedade termorresponsiva do complexo AuNP-BeCen1

O ordenamento controlado de pequenas estruturas apresenta grande interesse prático e fundamental para aplicações tecnológicas (14). Quando uma solução de BeCen1 é transferida de uma temperatura baixa para alta, sua turbidez muda de acordo com um padrão reprodutível, incluindo um tempo de atraso, uma fase de rápido aumento e um platô final (Figura 28). A cinética e os parâmetros de equilíbrio dependem da temperatura final (65). Este padrão tem sido associado a um processo de polimerização controlado por nucleação reversível, começando com o processo de nucleação, durante o qual alguns monômeros se associam para formar um núcleo ou aglomerados que servem como iniciadores da formação

do polímero (65). A inclinação da curva está associada com a taxa de polimerização e o platô final é determinado pelo tamanho dos objetos que espalham.

Para verificar a influência das AuNPs neste processo de polimerização da proteína, realizaram-se medidas de espalhamento em função da temperatura para o complexo AuNP-BeCen1 (Figura 28a) e para a proteína livre aproximadamente na mesma concentração (Figura 28b). Um controle foi realizado utilizando uma suspensão de AuNPs estabilizadas em PAMAM-G4 apenas para verificar o comportamento das nanopartículas neste processo (Figura 28c).

Analisando os gráficos, fica evidente que as AuNPs não apresentam esta propriedade por si só (Figura 28c), já que nenhuma alteração significativa no espalhamento foi observada. Já na Figura 28a observa-se, a 45 °C, um grande aumento no espalhamento chegando a intensidades muito altas. No entanto, na medida de 55 °C observou-se uma queda abrupta do espalhamento, acompanhada da formação de alguns pequenos aglomerados na amostra. Na Figura 28b, este aumento é mais sutil, começando levemente em 45 °C e apresentando um espalhamento mais significativo a partir de 55 °C. Comparando as intensidades nas Figuras 28a e 28b, nota-se que o espalhamento é bem maior para o complexo, se comparado com a proteína livre. Este aumento pode estar relacionado a dois fatores: presença das nanopartículas que já são caracterizadas pelo elevado espalhamento da luz, ou formação de estruturas maiores.

Figura 28 - Espalhamento da luz a 350 nm como função do tempo após rápida transferência da solução do gelo para uma dada temperatura em tampão Tris pH = 7,0: a) AuNP-BeCen1, b) BeCen1 livre e c) AuNP-PAMAM G4.

Estudos anteriores realizados com esta proteína (67) mostram que este processo de polimerização controlado pela temperatura é reversível. Este comportamento reversível como função da temperatura também foi observado para a centrina humana (HsCen2) por Tourbez e colaboradores (65). Ainda, este processo de reversibilidade tem sido descrito como imediato, ou seja, uma vez que a suspensão é transferida de uma temperatura elevada para o gelo a turbidez da suspensão diminui rapidamente, fazendo com que retome a sua aparência inicial. Este fenômeno indica a desintegração dos monômeros que formavam os polímeros assim que o aquecimento é retirado. Quando esta suspensão de proteína é novamente aquecida, observa-se o aumento da turbidez, o que comprova que o processo de polimerização controlada pela temperatura é reversível.

Como mostrado na Figura 28a, o complexo AuNP-Becen1 apresentou uma queda no espalhamento a 55 °C, fenômeno que não foi observado para a BeCen1. Para verificar a reversibilidade deste processo, esta suspensão foi deixada no gelo por tempos sucessivos e, em seguida, seu espalhamento a 45 °C era medido (Figura 29). Observa-se que após 15 minutos no gelo, o complexo praticamente não apresentou aumento no espalhamento. Após 30 minutos adicionais no gelo, o espalhamento a 45 °C foi novamente medido e, neste caso, observou-se um ligeiro aumento. No entanto, somente a partir de 1 hora no gelo antes da medida é que foi possível observar um aumento significativo no espalhamento.

A partir destes resultados é possível inferir que a conjugação com as AuNPs não prejudicou o processo de polimerização controlada por temperatura da proteína. No entanto, a presença das nanopartículas provocou um atraso no processo de desintegração dos componentes que formam os agregados para retomar sua forma inicial. Este fenômeno pode estar relacionado ao fato de que as nanopartículas, por possuírem uma elevada energia de superfície, possuam uma tendência natural de agregação. Assim, quando são colocadas muito próximas umas às outras tendem a permanecer nesta posição, dificultando o processo de desagregação.

Figura 29 - Espalhamento da luz a 350 nm como função do tempo do complexo AuNP-Becen1 a 45 °C o complexo AuNP-Becen1 após ter sido submetido a elevadas temperaturas (Figura 28a) e, posteriormente, passar diferentes tempos no gelo.

Este processo de polimerização controlada pela temperatura também foi monitorado por TEM. Neste caso, imagens do complexo AuNP-BeCen1 foram obtidas para amostras com e sem aquecimento. No primeiro caso, a amostra foi aquecida a 45 °C durante 15 minutos e, então, uma gota foi depositada sobre a grade de cobre recoberta com carbono e seca em estufa a aproximadamente 40 °C. A Figura 30 mostra as imagens.

Observa-se uma diferença geral no padrão da amostra com e sem aquecimento. Na Figura 30b, as nanopartículas parecem se organizar em grupos, enquanto na Figura 30a, elas se apresentam uniformemente distribuídas. Esta mudança de disposição das nanopartículas deve estar relacionada ao processo de agregação controlada por temperatura da proteína BeCen1. No entanto, não se observou a formação de grandes filamentos como era esperado. Isto pode estar relacionado a manipulação da amostra antes da realização das medidas, ou ao alto vácuo do microscópio. Além disso, como a tensão de aceleração do microscópio utilizado era elevada (200 kV), imagens de regiões com grupamentos maiores, e consequentemente com uma maior quantidade de proteína, eram muito difíceis de serem obtidas devido à degradação da amostra com a incidência do feixe. Por este motivo, as amostras também tinham que ser muito diluídas, o que pode dificultar a formação dos filamentos.

Figura 30 - Imagens de TEM do complexo AuNP-BeCen1 a) antes e b) após o aquecimento.

Figura 31 - Representação esquemática do processo de agregação controlada induzida pela temperatura do complexo AuNP-BeCen1.

O complexo AuNP-BeCen1 desenvolvido parece envolver um processo de ordenamento reversível induzido por temperatura, como representado na Figura 31. Estes novos nanocompósitos “inteligentes” apresentam grande interesse prático e fundamental (14) e tem se mostrado cada vez mais importantes para o desenvolvimento de novos materiais com potencial para muitas aplicações que vão desde liberação controlada de medicamentos (114) até biossensores (115) e sistemas de micro e nanofluidica (116).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a importância do estudo e desenvolvimento de novos nanobiocompósitos, uma vez que a biofuncionalização de nanopartículas pode conferir interessantes propriedades adicionais a estes sistemas. Neste caso, a funcionalização de AuNPs com duas proteínas distintas permitiu a obtenção de dois sistemas: nanobiocompósitos “teranósticos” com potencial para aplicações no diagnóstico e tratamento de câncer e termorresponsivos, onde a agregação das nanopartículas é controlada pela dependência com a temperatura da biomolécula.

No primeiro sistema, a metodologia que se mostrou mais eficiente para a conjugação foi a complexação das AuNP-PAMAM G4 com a proteína Jacalina marcada com uma fluoresceína. Espectroscopia no UV-VIS confirmou a presença da proteína mesmo após sucessivas centrifugações e lavagens em tampão. Imagens de TEM mostraram a formação da camada de proteína em torno das AuNP-PAMAM G4. A formação do complexo foi corroborada ainda por medidas espectroscópicas e de calorimetria, indicando que a interação deve ser dirigida por entropia e que ocorra na direção das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, principalmente ácido aspártico e glutâmico, tirosina e serina.

De acordo com os resultados de CD, a presença das AuNP-PAMAM G4 não alterou a estrutura secundária da Jacalina. Testes realizados em cultura de células revelaram que o complexo apresentou maior afinidade e citotoxicidade pelas células de carcinoma cervical humano (HeLa), se comparadas com fibroblastos saudáveis de adipócitos de camundongo (L929). Este resultado é de extrema relevância para aplicações em áreas como tratamento e diagnóstico de câncer.

No caso da formação do complexo AuNP-BeCen1, a síntese de AuNPs *in situ* mostrou-se o método mais eficaz. A separação por cromatografia de exclusão molecular evidenciou a formação do complexo, que também foi confirmada por espectroscopia no UV-VIS e Eletroforese em gel de poliacrilamida. Análises de CD mostraram uma pequena diminuição no conteúdo de α -hélices, confirmado por Espectroscopia no Infravermelho, que indicam que a interação com as AuNPs deve ocorrer na direção dos grupamentos amida desta proteína. Medidas de espalhamento de luz revelaram um aumento da turbidez da suspensão com o aumento da temperatura, evidenciando que a presença das nanopartículas não alterou

significativamente a propriedade da proteína de formar filamentos nanométricos em função da temperatura. Imagens de TEM do complexo AuNP-BeCen1 com e sem aquecimento confirmaram uma mudança de padrão no arranjo das AuNP em função da temperatura. Estes resultados revelam a possibilidade de fabricação de nanobiocompósitos termorresponsivos, o que pode ser muito importante para aplicações em nanodispositivos, especialmente quando há a necessidade de orientar ou controlar a agregação das nanopartículas.

7. PERSPECTIVAS

Análises de Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia Eletrônica de Varredura com canhão de emissão por efeito de campo (SEM-FEG) podem ser úteis para um estudo mais detalhado e observação da formação de agregados induzidos pela temperatura no complexo AuNP-BeCen1.

Microscopia confocal e citometria de fluxo podem fornecer informações importantes a respeito da afinidade do complexo AuNP-PAMAM G4/Jacalina-FITC por células tumorais e, por isso, devem ser realizadas para confirmar este comportamento. Além disso, a realização de testes utilizando outras linhagens celulares é importante para verificar a especificidade deste complexo.

Experimentos de supressão da fluorescência mais detalhados, utilizando, por exemplo, variação da temperatura devem ser realizados para entender melhor a interação entre as AuNP-PAMAM G4 e a Jacalina, por meio da avaliação da dependência da constante que afinidade com a temperatura. A avaliação deste parâmetro é útil para diferenciar o processo de supressão como estático ou dinâmico.

REFERÊNCIAS

- 1 KUMAR, C. S. S. R. **Biofunctionalization of nanomaterials**. Weinheim: WILEY-VCH, 2005. v.1
- 2 KATZ, E.; WILLNER, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, n. 45, p. 6042-108, 2004.
- 3 NALWA, H. S. **Nanoestrutured materials and nanotechnology**. San Diego: Academic Press, 2002.
- 4 FREITAS JUNIOR, R. A. What is nanomedicine? **Nanomedicine**, v. 1, n. 1, p. 2-9, 2005.
- 5 KANJANAWARUT, R.; SU, X. D. Colorimetric detection of DNA using unmodified metallic nanoparticles and peptide nucleic acid probes. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 6122-6129, 2009.
- 6 CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTO, V.; BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA, O. N.; NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 35, p. 17478-17483, 2006.
- 7 ROTH, J. The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 106, n. 1, p. 1-8, 1996.
- 8 HAINFELD, J. F.; SLATKIN, D. N.; FOCELLA, T. M.; SMILOWITZ, H. M. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. **British Journal of Radiology**, v. 79, n. 939, p. 248-253, 2006.
- 9 BARRETO, J. A.; O'MALLEY, W.; KUBEIL, M.; GRAHAM, B.; STEPHAN, H.; SPICCIA, L. Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. **Advanced Materials**, v. 23, n. 12, p. H18-H40, 2011.
- 10 NGHIEM, T. H. L.; LA, T. H.; VU, X. H.; CHU, V. H.; NGUYEN, T. H.; LE, Q. H.; FORT, E.; DO, Q. H.; TRAN, H. N. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 1, n. 2, p. 025009, 2010.

- 11 OYELERE, A. K.; CHEN, P. C.; HUANG, X. H.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1490-1497, 2007.
- 12 MEDLEY, C. D.; BAMRUNGSAP, S.; TAN, W. H.; SMITH, J. E. Aptamer-conjugated nanoparticles for cancer cell detection. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 727-734, 2011.
- 13 YANG, L. L.; MAO, H.; WANG, Y. A.; CAO, Z. H.; PENG, X. H.; WANG, X. X.; DUAN, H. W.; NI, C. C.; YUAN, Q. G.; ADAMS, G.; SMITH, M. Q.; WOOD, W. C.; GAO, X. H.; NIE, S. M. Single chain epidermal growth factor receptor antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor targeting and imaging. **Small**, v. 5, n. 2, p. 235-243, 2009.
- 14 KIELY, C. J.; FINK, J.; BRUST, M.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D. J. Spontaneous ordering of bimodal ensembles of nanoscopic gold clusters. **Nature**, v. 396, n. 6710, p. 444-446, 1998.
- 15 MAO, C.; SOLIS, D. J.; REISS, B. D.; KOTTMANN, S. T.; SWEENEY, R. Y.; HAYHURST, A.; GEORGIOU, G.; IVERSON, B.; BELCHER, A. M. Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires. **Science**, v. 303, n. 5655, p. 213-7, 2004.
- 16 SHARMA, J.; CHHABRA, R.; CHENG, A.; BROWNELL, J.; LIU, Y.; YAN, H. Control of self-assembly of DNA tubules through integration of gold nanoparticles. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 112-116, 2009.
- 17 **The royal society and The Royal Academy of Engineering Report Nanoscience and Nanotechnologies**, 2004.
- 18 WANG, Y. L.; XIA, Y. N. Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersed spherical colloids of low melting-point metals. **Nano Letters**, v. 4, n. 10, p. 2047-2050, 2004.
- 19 OZIN, G. A. A., A. C. **Nanochemistry: a chemical approach to nanomaterials**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005.
- 20 LIM, B.; JIANG, M. J.; CAMARGO, P. H. C.; CHO, E. C.; TAO, J.; LU, X. M.; ZHU, Y. M.; XIA, Y. N. Pd-Pt Bimetallic Nanodendrites with High Activity for Oxygen Reduction. **Science**, v. 324, n. 5932, p. 1302-1305, 2009.
- 21 ALIVISATOS, A. P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 933-937, 1996.

- 22 ATKINS, P. D. P., J. **Físico-Química**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora, 2004. v.2
- 23 SPERLING, R. A.; RIVERA GIL, P.; ZHANG, F.; ZANELLA, M.; PARAK, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society Review**, v. 37, n. 9, p. 1896-1908, 2008.
- 24 HAISS, W.; THANH, N. T. K.; AVEYARD, J.; FERNIG, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215-4221, 2007.
- 25 SONNICHSEN, C.; REINHARD, B. M.; LIPHARDT, J.; ALIVISATOS, A. P. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 741-5, 2005.
- 26 WILSON, R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. **Chemical Society Review**, v. 37, n. 9, p. 2028-45, 2008.
- 27 KLAR, T.; PERNER, M.; GROSSE, S.; VON PLESSEN, G.; SPIRKL, W.; FELDMANN, J. Surface-plasmon resonances in single metallic nanoparticles. **Physical Review Letters**, v. 80, n. 19, p. 4249-4252, 1998.
- 28 CHOI, M. R.; STANTON-MAXEY, K. J.; STANLEY, J. K.; LEVIN, C. S.; BARDHAN, R.; AKIN, D.; BADVE, S.; STURGIS, J.; ROBINSON, J. P.; BASHIR, R.; HALAS, N. J.; CLARE, S. E. A cellular Trojan horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. **Nano Letters**, v. 7, n. 12, p. 3759-3765, 2007.
- 29 GLAZER, E. S.; ZHU, C. H.; MASSEY, K. L.; THOMPSON, C. S.; KALUARACHCHI, W. D.; HAMIR, A. N.; CURLEY, S. A. Noninvasive radiofrequency field destruction of pancreatic adenocarcinoma xenografts treated with targeted gold nanoparticles. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 23, p. 5712-5721, 2010.
- 30 COLTHUP, N. B. D., L.H.; WIBERLEY, S.E. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**. San Diego: Academic Press, 1990.
- 31 HE, L.; MUSICK, M. D.; NICEWARNER, S. R.; SALINAS, F. G.; BENKOVIC, S. J.; NATAN, M. J.; KEATING, C. D. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 38, p. 9071-9077, 2000.

- 32 ROSI, N. L.; GILJOHANN, D. A.; THAXTON, C. S.; LYTTON-JEAN, A. K. R.; HAN, M. S.; MIRKIN, C. A. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. **Science**, v. 312, n. 5776, p. 1027-1030, 2006.
- 33 TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. n. 11, p. 55-&, 1951.
- 34 JANA, N. R.; PENG, X. G. Single-phase and gram-scale routes toward nearly monodisperse Au and other noble metal nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 47, p. 14280-14281, 2003.
- 35 BRUST, M.; FINK, J.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D. J.; KIELY, C. SYNTHESIS AND REACTIONS OF FUNCTIONALIZED GOLD NANOPARTICLES. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, v. n. 16, p. 1655-1656, 1995.
- 36 EASTOE, J.; HOLLAMBY, M. J.; HUDSON, L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 128, n. 5-15, 2006.
- 37 TUNCEL, D.; DEMIR, H. V. Conjugated polymer nanoparticles. **Nanoscale**, v. 2, n. 4, p. 484-494, 2010.
- 38 WANG, P.; ZHAO, X. H.; WANG, Z. Y.; MENG, M.; LI, X.; NING, Q. A. Generation 4 polyamidoamine dendrimers is a novel candidate of nano-carrier for gene delivery agents in breast cancer treatment. **Cancer Letters**, v. 298, n. 1, p. 34-49, 2010.
- 39 ESFAND, R.; TOMALIA, D. A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 8, p. 427-436, 2001.
- 40 CROOKS, R. M.; ZHAO, M. Q.; SUN, L.; CHECHIK, V.; YEUNG, L. K. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 3, p. 181-190, 2001.
- 41 ZHAO, M. Q.; SUN, L.; CROOKS, R. M. Preparation of Cu nanoclusters within dendrimer templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 19, p. 4877-4878, 1998.
- 42 ZHAO, M. Q.; CROOKS, R. M. Homogeneous hydrogenation catalysis with monodisperse, dendrimer-encapsulated Pd and Pt nanoparticles. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 38, n. 3, p. 364-366, 1999.

- 43 TOKUHISA, H.; ZHAO, M. Q.; BAKER, L. A.; PHAN, V. T.; DERMODY, D. L.; GARCIA, M. E.; PEEZ, R. F.; CROOKS, R. M.; MAYER, T. M. Preparation and characterization of dendrimer monolayers and dendrimer-alkanethiol mixed monolayers adsorbed to gold. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 18, p. 4492-4501, 1998.
- 44 ZHONG, G. X.; LIU, A. L.; CHEN, X. H.; WANG, K.; LIAN, Z. X.; LIU, Q. C.; CHEN, Y. Z.; DU, M.; LIN, X. H. Electrochemical biosensor based on nanoporous gold electrode for detection of PML/RAR alpha fusion gene. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 9, p. 3812-3817, 2011.
- 45 PILO-PAIS, M.; GOLDBERG, S.; SAMANO, E.; LABEAN, T. H.; FINKELSTEIN, G. Connecting the nanodots: programmable nanofabrication of fused metal shapes on DNA templates. **Nano Letters**, v. 11, n. 8, p. 3489-3492, 2011.
- 46 AUBIN-TAM, M. E.; HAMAD-SCHIFFERLI, K. Gold nanoparticle cytochrome c complexes: The effect of nanoparticle ligand charge on protein structure. **Langmuir**, v. 21, n. 26, p. 12080-12084, 2005.
- 47 PETERSEN, S.; JAKOBI, J.; BARCIKOWSKI, S. In situ bioconjugation—Novel laser based approach to pure nanoparticle-conjugates. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 10, p. 5435-5438, 2009.
- 48 BURT, J. L.; GUTIERREZ-WING, C.; MIKI-YOSHIDA, M.; JOSE-YACAMAN, M. Noble-metal nanoparticles directly conjugated to globular proteins. **Langmuir**, v. 20, n. 26, p. 11778-11783, 2004.
- 49 XIE, J.; LEE, S.; CHEN, X. Y. Nanoparticle-based theranostic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 11, p. 1064-1079, 2010.
- 50 LIONG, M.; LU, J.; KOVOCHICH, M.; XIA, T.; RUEHM, S. G.; NEL, A. E.; TAMANOI, F.; ZINK, J. I. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. **ACS Nano**, v. 2, n. 5, p. 889-896, 2008.
- 51 BHOJANI, M. S.; VAN DORT, M.; REHEMTULLA, A.; ROSS, B. D. Targeted Imaging and Therapy of Brain Cancer Using Theranostic Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 1921-1929, 2010.
- 52 SHARON, N.; LIS, H. LECTINS AS CELL RECOGNITION MOLECULES. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 227-234, 1989.

- 53 JEYAPRAKASH, A. A.; RANI, P. G.; REDDY, G. B.; BANUMATHI, S.; BETZEL, C.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Crystal structure of the jacalin-T-antigen complex and a comparative study of lectin-T-antigen complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 321, n. 4, p. 637-645, 2002.
- 54 KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, n. 2, p. 193-211, 1998.
- 55 BOURNE, Y.; ASTOUL, C. H.; ZAMBONI, V.; PEUMANS, W. J.; MENU-BOUAOUICHE, L.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGE, P. Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. **Biochemical Journal**, v. 364, n. 173-180, 2002.
- 56 SASTRY, M. V. K.; BANARJEE, P.; PATANJALI, S. R.; SWAMY, M. J.; SWARNALATHA, G. V.; SUROLIA, A. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus Integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (b-D-Gal(1-3)D-GalNac). **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 25, p. 1726-1733, 1986.
- 57 KOMATH, S. S.; BHANU, K.; MAIYA, B. G.; SWAMY, M. J. Binding of porphyrins by the tumor-specific lectin, jacalin jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) agglutinin. **Bioscience Reports**, v. 20, n. 4, p. 265-276, 2000.
- 58 SANKARANARAYANAN, R.; SEKAR, K.; BANERJEE, R.; SHARMA, V.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 7, p. 596-603, 1996.
- 59 YU, L. G. The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. **Glycoconjugate Journal**, v. 24, n. 8, p. 411-420, 2007.
- 60 SI, S.; MANDAL, T. K. pH-controlled reversible assembly of peptide-functionalized gold nanoparticles. **Langmuir**, v. 23, n. 1, p. 190-195, 2007.
- 61 OSBORNE, E. A.; JARRETT, B. R.; TU, C. Q.; LOUIE, A. Y. Modulation of T2 Relaxation Time by Light-Induced, Reversible Aggregation of Magnetic Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 17, p. 5934-+, 2010.
- 62 ZHU, M. Q.; WANG, L. Q.; EXARHOS, G. J.; LI, A. D. Q. Thermosensitive gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 9, p. 2656-2657, 2004.
- 63 STUART, M. A. C.; HUCK, W. T. S.; GENZER, J.; MULLER, M.; OBER, C.; STAMM, M.; SUKHORUKOV, G. B.; SZLEIFER, I.; TSUKRUK, V. V.; URBAN, M.; WINNIK, F.;

- ZAUSCHER, S.; LUZINOV, I.; MINKO, S. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. **Nature Materials**, v. 9, n. 2, p. 101-113, 2010.
- 64 MANN, S. S., W.; LI, M.; CONNOLLY, S.; FITZMAURICE, D. Biologically programmed nanoparticle assembly. **Advanced Materials**, v. 12, n. 2, p. 147-150, 2000.
- 65 TOURBEZ, M.; FIRANESCU, C.; YANG, A.; UNIPAN, L.; DUCHAMBON, P.; BLOUQUIT, Y.; CRAESCU, C. T. Calcium-dependent self-assembly of human centrin 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 47672-47680, 2004.
- 66 RIBICHICH, K. F.; GOMES, S. L. *Blastocladiella emersonii* expresses a centrin similar to Chlamydomonas reinhardtii isoform not found in late-diverging fungi. **FEBS Letters**, v. 579, n. 20, p. 4355-4360, 2005.
- 67 CAMARGO, A. I. **Estudos estruturais e termodinâmicos das centrinas BeCen1 e BeCen3 do fungo Blastocladiella emersonii**. 27 de maio de 2011 (2011). 119p. Doutorado - Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2011.
- 68 KUNZMANN, A.; ANDERSSON, B.; THURNHERR, T.; KRUG, H.; SCHEYNIUS, A.; FADEEL, B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1810, n. 3, p. 361-373, 2011.
- 69 SOENEN, S. J.; RIVERA-GIL, P.; MONTENEGRO, J. M.; PARAK, W. J.; DE SMEDT, S. C.; BRAECKMANS, K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. **Nano Today**, v. 6, n. 5, p. 446-465, 2011.
- 70 KENNEDY, L. C.; BICKFORD, L. R.; LEWINSKI, N. A.; COUGHLIN, A. J.; HU, Y.; DAY, E. S.; WEST, J. L.; DREZEK, R. A. A new era for cancer treatment: gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. **Small**, v. 7, n. 2, p. 169-183, 2011.
- 71 PAN, Y.; LEIFERT, A.; RUAU, D.; NEUSS, S.; BORNEMANN, J.; SCHMID, G.; BRANDAU, W.; SIMON, U.; JAHNEN-DECHENT, W. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. **Small**, v. 5, n. 18, p. 2067-2076, 2009.
- 72 YEN, H. J.; HSU, S. H.; TSAI, C. L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. **Small**, v. 5, n. 13, p. 1553-1561, 2009.
- 73 GU, Y. J.; CHENG, J. P.; LIN, C. C.; LAM, Y. W.; CHENG, S. H.; WONG, W. T. Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, n. 2, p. 196-204, 2009.

- 74 GOODMAN, C. M.; MCCUSKER, C. D.; YILMAZ, T.; ROTELLO, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. **Bioconjugate Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 897-900, 2004.
- 75 SHI, X. Y.; GANSER, T. R.; SUN, K.; BALOGH, L. P.; BAKER, J. R. Characterization of crystalline dendrimer-stabilized gold nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 17, n. 4, p. 1072-1078, 2006.
- 76 CRESPILO, F. N.; GHICA, M. E.; ZUCOLOTTI, V.; NART, F. C.; OLIVEIRA, O. N.; BRETT, C. M. A. Electroactive nanostructured membranes (ENM): Synthesis and electrochemical properties of redox mediator-modified gold nanoparticles using a dendrimer layer-by-layer approach. **Electroanalysis**, v. 19, n. 7-8, p. 805-812, 2007.
- 77 MANNA, A.; IMAE, T.; AOI, K.; OKADA, M.; YOGO, T. Synthesis of dendrimer-passivated noble metal nanoparticles in a polar medium: Comparison of size between silver and gold particles. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 5, p. 1674-1681, 2001.
- 78 AKHTAR, M. J.; AHAMED, M.; KUMAR, S.; SIDDIQUI, H.; PATIL, G.; ASHQIN, M.; AHMAD, I. Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells. **Toxicology**, v. 276, n. 2, p. 95-102, 2010.
- 79 LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions. **Nano Today**, v. 3, n. 1-2, p. 40-47, 2008.
- 80 BOHREN, C. **Absorption and scattering of light by small particles**. New York: John Wiley, 1983.
- 81 VAN HOLDE, K. E. J., W.C.; HO, P.S. **Principles of physical biochemistry**. 2nd ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2006.
- 82 MAHMOUDI, M.; LYNCH, I.; EJTEHADI, M. R.; MONOPOLI, M. P.; BOMBELLI, F. B.; LAURENT, S. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5610-5637, 2011.
- 83 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1999.
- 84 BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.

- 85 LADBURY, J. E. C., B. Z. **Biocalorimetry: applications in the biological sciences**. Chichester: John Wiley, 1998.
- 86 JOSHI, H.; SHIRUDE, P. S.; BANSAL, V.; GANESH, K. N.; SASTRY, M. Isothermal titration calorimetry studies on the binding of amino acids to gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 31, p. 11535-11540, 2004.
- 87 DE, M.; MIRANDA, O. R.; RANA, S.; ROTELLO, V. M. Size and geometry dependent protein-nanoparticle self-assembly. **Chemical Communications**, v. n. 16, p. 2157-2159, 2009.
- 88 DE, M.; YOU, C. C.; SRIVASTAVA, S.; ROTELLO, V. M. Biomimetic interactions of proteins with functionalized nanoparticles: a thermodynamic study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 35, p. 10747-10753, 2007.
- 89 LINDMAN, S.; LYNCH, I.; THULIN, E.; NILSSON, H.; DAWSON, K. A.; LINSE, S. Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-isopropylacrylamide/N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles: effects of particle size and hydrophobicity. **Nano Letters**, v. 7, n. 4, p. 914-920, 2007.
- 90 BAIER, G.; COSTA, C.; ZELLER, A.; BAUMANN, D.; SAYER, C.; ARAUJO, P. H. H.; MAILANDER, V.; MUSYANOVYCH, A.; LANDFESTER, K. BSA adsorption on differently charged polystyrene nanoparticles using isothermal titration calorimetry and the influence on cellular uptake. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 5, p. 628-638, 2011.
- 91 BOUCHEMAL, K. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 21-22, p. 960-972, 2008.
- 92 PECORA, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, n. 2, p. 123-131, 2000.
- 93 REIPA, V.; PURDUM, G.; CHOI, J. Measurement of nanoparticle concentration using quartz crystal microgravimetry. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 49, p. 16112-16117, 2010.
- 94 LIU, X. O.; ATWATER, M.; WANG, J. H.; HUO, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 58, n. 1, p. 3-7, 2007.

- 95 TSAI, D. H.; DELRIO, F. W.; KEENE, A. M.; TYNER, K. M.; MACCUSPIE, R. I.; CHO, T. J.; ZACHARIAH, M. R.; HACKLEY, V. A. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. **Langmuir**, v. 27, n. 6, p. 2464-2477, 2011.
- 96 MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C. O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.
- 97 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.
- 98 LOKESH, K. S.; NARAYANAN, V.; SAMPATH, S. Phthalocyanine macrocycle as stabilizer for gold and silver nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 167, n. 1-2, p. 97-102, 2009.
- 99 JOSHI, P.; CHAKRABORTY, S.; DEY, S.; SHANKER, V.; ANSARI, Z. A.; SINGH, S. P.; CHAKRABARTI, P. Binding of chloroquine-conjugated gold nanoparticles with bovine serum albumin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 355, n. 2, p. 402-409, 2011.
- 100 SHPIGELMAN, A.; ISRAELI, G.; LIVNEY, Y. D. Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 735-743, 2010.
- 101 HE, Y.; WANG, Y. W.; TANG, L. F.; LIU, H.; CHEN, W.; ZHENG, Z. L.; ZOU, G. L. Binding of puerarin to human serum albumin: a spectroscopic analysis and molecular docking. **Journal of Fluorescence**, v. 18, n. 2, p. 433-442, 2008.
- 102 FROELICH, E.; MANDEVILLE, J. S.; JENNINGS, C. J.; SEDAGHAT-HERATI, R.; TAJMIR-RIahi, H. A. Dendrimers bind human serum albumin. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 19, p. 6986-6993, 2009.
- 103 BARTH, A. The infrared absorption of amino acid side chains. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 74, n. 3-5, p. 141-173, 2000.
- 104 RAUTARAY, D.; MANDAL, S.; SASTRY, M. Synthesis of hydroxyapatite crystals using amino acid-capped gold nanoparticles as a scaffold. **Langmuir**, v. 21, n. 11, p. 5185-5191, 2005.

- 105 JURGENS, L.; NICHTL, A.; WERNER, U. Electron density imaging of protein films on gold-particle surfaces with transmission electron microscopy. **Cytometry**, v. 37, n. 2, p. 87-92, 1999.
- 106 THOBHANI, S.; ATTREE, S.; BOYD, R.; KUMARSWAMI, N.; NOBLE, J.; SZYMANSKI, M.; PORTER, R. A. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. **Journal of Immunological Methods**, v. 356, n. 1-2, p. 60-69, 2010.
- 107 OLIVEIRA, C.; NICOLAU, A.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. 568932, 2011.
- 108 SAKUMA, S.; YANO, T.; MASAOKA, Y.; KATAOKA, M.; HIWATARI, K.; TACHIKAWA, H.; SHOJI, Y.; KIMURA, R.; MA, H. Y.; YANG, Z. J.; TANG, L.; HOFFMAN, R. M.; YAMASHITA, S. In vitro/in vivo biorecognition of lectin-immobilized fluorescent nanospheres for human colorectal cancer cells. **Journal of Controlled Release**, v. 134, n. 1, p. 2-10, 2009.
- 109 PAN, Y.; NEUSS, S.; LEIFERT, A.; FISCHLER, M.; WEN, F.; SIMON, U.; SCHMID, G.; BRANDAU, W.; JAHNEN-DECHENT, W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. **Small**, v. 3, n. 11, p. 1941-1949, 2007.
- 110 CEDERVALL, T.; LYNCH, I.; LINDMAN, S.; BERGGARD, T.; THULIN, E.; NILSSON, H.; DAWSON, K. A.; LINSE, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2050-2055, 2007.
- 111 WANGOO, N.; BHASIN, K. K.; MEHTA, S. K.; SURI, C. R. Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: Bioconjugation and binding studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 323, n. 2, p. 247-254, 2008.
- 112 MOSS, D.; NABEDRYK, E.; BRETON, J.; MANTELE, W. Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared-spectroscopy and protein electrochemistry evaluation of the technique with cytochrome-c. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 3, p. 565-572, 1990.
- 113 GARCIA-SERRANO, J.; PAL, U.; HERRERA, A. M.; SALAS, P.; ANGELES-CHAVEZ, C. One-step "green" synthesis and stabilization of Au and Ag nanoparticles using ionic polymers. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 16, p. 5146-5153, 2008.

114 HRIBAR, K. C.; LEE, M. H.; LEE, D.; BURDICK, J. A. Enhanced release of small molecules from near-infrared light responsive polymer-nanorod composites. **ACS Nano**, v. 5, n. 4, p. 2948-2956, 2011.

115 ANKER, J. N.; HALL, W. P.; LYANDRES, O.; SHAH, N. C.; ZHAO, J.; VAN DUYNE, R. P. Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature Materials**, v. 7, n. 6, p. 442-453, 2008.

116 MENDES, P. M. Stimuli-responsive surfaces for bio-applications. **Chemical Society Review**, v. 37, n. 11, p. 2512-2529, 2008.