

Universidade de São Paulo
Escola Politécnica

CAMILA MENEZES FREIRE DE SOUZA

**Desenvolvimento de Nanopartículas de Ouro Funcionalizadas com
Proteínas para Aplicações Farmacêuticas**

São Paulo

2022

CAMILA MENEZES FREIRE DE SOUZA

**Desenvolvimento de Nanopartículas de Ouro Funcionalizadas com Proteínas
para Aplicações Farmacêuticas**

Versão original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia de Bioprocessos

Orientador: Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni

São Paulo

2022

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.

Catálogo-na-publicação

SOUZA, CAMILA MENEZES FREIRE DE

Desenvolvimento de Nanopartículas de ouro Funcionalizadas com Proteínas para Aplicações Farmacêuticas / C. M. F. D. SOUZA -- São Paulo, 2022.

76 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.nanopartícula de ouro 2.SARSCOV2 3.Echistatina 4.Adsorção 5.câncer
I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

SOUZA, CAMILA MENEZES FREIRE DE **Desenvolvimento de Nanopartículas de Ouro Funcionalizadas com Proteínas para Aplicações Farmacêuticas** / C. M. F. D. SOUZA -- São Paulo, 2022.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha Laurinha.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, Jesus e Nossa Senhora;

Aos meus pais, especialmente ao meu pai por toda a ajuda;

Ao meus irmãos pelo apoio em alguns momentos;

Ao meu orientador, prof. Adriano Azzoni, por todo o aprendizado, ajuda, compreensão e cuidado ao longo deste trabalho;

Aos pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do ICB, em especial à pesquisadora Marianna Favaro pela parceria e ajuda na realização dos experimentos;

Aos pesquisadores do Instituto Butantan, em especial ao prof Dr Geraldo Santana Magalhães pela parceria nos trabalhos com a proteína echistatina;

Aos colegas da pós-graduação, Isabela, Silas e Ivana, pela companhia na sala dos alunos e no bandeijão;

A todos que de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho.

RESUMO

Nanopartículas de ouro (AuNPs) possuem grande potencial de aplicação farmacêutica devido à sua biocompatibilidade, propriedades ópticas únicas e pela facilidade de modificação de superfície tendo em vista a ligação de moléculas com função terapêutica. Algumas destas potenciais aplicações são a veiculação de drogas para células tumorais e a entrega de antígenos protéicos em vacinas avançadas, tema que tem atraído a atenção da comunidade científica, em especial após a pandemia do Coronavírus. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi estudar a síntese de AuNPs que apresentem características físico-químicas interessantes para aplicações farmacêuticas, tendo em vista a funcionalização com proteínas visando ao desenvolvimento de novas plataformas vacinais e de entrega de drogas. A síntese de AuNPs por meio de redução com aminoácidos e citrato de sódio foi estudada, sendo caracterizados o tamanho, a carga superficial e a estabilidade das nanopartículas. As AuNPs produzidas foram então funcionalizadas não apenas com a proteína repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*), mas também com o domínio protéico RBD (*Receptor Binding Protein*) da proteína S do vírus Covid-19 e a proteína Echistatina (desintegrina). Os complexos AuNP+proteína foram então caracterizados e testados quanto à funcionalidade biológica, por meio de transfecção de células de mamífero. Pôde-se, assim, agregar conhecimentos para o desenvolvimento de uma nova plataforma de veiculação e entrega de drogas e antígenos vacinais.

Palavras-chaves: nanopartículas de ouro, adsorção de proteínas, vacinas, células tumorais, entrega de drogas, echistatina.

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNPs) have great potential for pharmaceutical application due to their biocompatibility, unique optical properties and the easiness of surface modification in order to bind molecules with therapeutic function. Some of these potential applications are the delivery of drugs to tumor cells and the delivery of protein antigens in advanced vaccines, a topic that has attracted the attention of the scientific community, especially after the Coronavirus pandemic. Therefore, the objective of this work was to study the synthesis of AuNPs that present interesting physicochemical characteristics for pharmaceutical applications, considering the functionalization with proteins aiming at the development of new vaccine platforms and drug delivery. The synthesis of AuNPs through reduction with amino acids and sodium citrate was studied, characterizing the size, surface charge and stability of the nanoparticles. The AuNPs produced were then functionalized not only with the reporter protein GFP (Green Fluorescent Protein), but also with the protein domain RBD (Receptor Binding Protein) of the S protein of the Covid-19 virus and also the protein Echistatin (disintegrin). The AuNP+protein complexes were then characterized and tested for biological functionality, *via* mammalian cell transfection. It was thus possible to add knowledge for the development of a new platform for the transmission and delivery of drugs and vaccine antigens.

Key-words: nanoparticles gold, protein adsorption, echistatin, vaccines, drug delivery.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. NANOPARTÍCULA DE OURO	
2.1.1. Síntese de Nanopartículas de Ouro via Redução com Citrato de Sódio	
2.1.2. Síntese de Nanopartículas de ouro via Redução por Aminoácidos ...	
2.2. PROPRIEDADES ÓPTICAS E ESTRUTURA QUÍMICA	
2.2.1. Ressonância Plasmon de Superfície	
2.2.2. Espalhamento Dinâmico de Luz, Diâmetro Hidrodinâmico e Polidispersidade	
2.2.3. Potencial Zeta e Estabilidade Coloidal	
2.3. O CÂNCER E OS RECEPTORES INTEGRINA	
2.3.1. Desintegrina	
2.4. COVID-19 E O VÍRUS SARS-CoV-2	
3. OBJETIVOS.....	
3.1. OBJETIVO GERAL	
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	
4.1.1. Síntese de NPAus via redução por Citrato de Sódio	
4.1.2. Síntese de NPAus via redução por aminoácidos	
4.1.3 Determinação das Característica Físico-químicas das AuNP	
4.2.2. Funcionalização das AuNPs com Echistatina e GFP	
4.2.3. Cultivo e Transfecção de Células HeLa e U-87MG	
4.2.4. Estudo de Citotoxicidade	
4.3. ENSAIO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO VISANDO INDUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS	
4.3.1. Determinação da Capacidade de Adsorção de Proteínas em AuNPs	
4.3.1.4. Funcionalização das Nanopartículas de ouro às proteínas C-terminal e N-terminal visando ensaio de ELISA	
4.3.1.5. Ensaio de Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)	
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	
5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	
5.2.1. Parâmetros físico-químicos das AuNPs reduzidas por aminoácidos	
5.2.2. Parâmetros físico-químicos das nanopartículas reduzidas por meio de citrato de sódio	

5.3. ANÁLISE DE ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS POR NANOPARTÍCULAS REDUZIDAS POR CITRATO DE SÓDIO

5.3.1. Estudo da Capacidade de Adsorção da Proteína Modelo GFP em Nanopartículas de Ouro

5.3.2. Ensaio de Avaliação da Integridade da Proteína GFP por meio de Fluorimetria

5.3.3. Estudo de Capacidade de Adsorção da Proteína RBD (Covid-19) em Nanopartículas de Ouro

5.4. ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS HELA E U-87 COM NANOPARTÍCULAS REDUZIDAS POR CITRATO DE SÓDIO

6. CONCLUSÃO

7. REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia possibilita que agentes terapêuticos possam ser encapsulados ou adsorvidos em materiais nanoparticulados e entregues de maneira seletiva para células-alvo (CARVALHO et al., 2019). Diversos métodos de síntese de nanopartículas de ouro podem ser encontrados na literatura, resultando em nanopartículas nos mais variados tamanhos e formatos. Convencionalmente, o método de Turkevich et al. (1951) é amplamente utilizado, no qual o cloreto de ouro III é reduzido a ouro metálico na presença de citrato de sódio (TURKEVICH et al., 1951)

As nanopartículas de ouro exibem propriedades interessantes por serem, em geral, biocompatíveis, com baixa citotoxicidade e boa capacidade de funcionalização, podendo carrear diversas biomoléculas-alvo incluindo medicamentos, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (PALMA, 2017). A conjugação de compostos às nanopartículas oferecem diversas possibilidades, além da atuação ativa em células-alvo, pode ser empregada para melhorar a carga de superfície, diminuir a imunogenicidade, diminuir a agregação e aumentar a estabilidade e melhorar a captação celular (JAZAYERI, 2016).

Como terapia alvo em cânceres invasivos, as nanopartículas podem estar associadas a uma molécula de direcionamento com ação em células tumorais e, através de mecanismos de interação celular, melhorar significativamente o resultado terapêutico do tratamento da doença, minimizando o comprometimento das células saudáveis (JAHANGIRIAN et al, 2019).

Uma forma potencialmente interessante de direcionamento é por meio de receptores expressos nas membranas das células. A integrina $\alpha\beta3$ é um receptor transmembrana altamente expresso em alguns tipos de cânceres com fenótipos metastáticos e de rápida proliferação, dentre eles tumores sólidos de glioblastoma, osteosarcoma, melanoma e tumores pancreáticos. Portanto, proteínas desintegrinas, capazes de interagir especificamente com integrinas de células cancerígenas podem, possivelmente, serem utilizadas como drogas antitumorais ocasionando menores efeitos colaterais (SILVA, 2007).

Já na produção de vacinas existe uma busca por novas moléculas com capacidade adjuvante, para serem usadas em conjunto com antígenos em formulações de vacinas de subunidade proteica (NETO, 2018). Em 2020, a rápida disseminação da COVID-19 ao redor do mundo levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar uma pandemia, não havendo tratamentos disponíveis para o combate da doença, mostrando a urgência no desenvolvimento de uma vacina.

O principal alvo para o desenvolvimento da vacina contra a COVID-19 é a utilização da glicoproteína Spike, que através do domínio de ligação ao receptor celular (RBD) interage com a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) do hospedeiro e o uso de NPs para carrear o antígeno e promover imunização vem recebendo grande atenção (BUDEL, 2022). Estudos de SEKIMUKAI e colaboradores utilizam dois tipos de nanopartículas de ouro com tamanhos diferentes e à base de polímeros e demonstram bons resultados (SEKIMUKAI, 2020). Neste contexto, o presente trabalho objetiva sintetizar nanopartículas de ouro estáveis e avaliar seu potencial de funcionalização com proteínas especializadas atuando em duas modalidades - indução de anticorpos específicos e atuação antitumoral em células superexpressando integrina $\alpha\beta3$.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. NANOPARTÍCULA DE OURO

As Nanopartículas são definidas como átomos ou aglomerados de átomos e moléculas, cujo tamanho pertence à escala nanométrica. São classificadas como dispersões coloidais ou simplesmente colóides quando as partículas em solução são maiores que 1 nm e menores do que 1.000 nm (CUNHA, 2020).

As dispersões coloidais são misturas heterogêneas de pelo menos duas fases diferentes, com a matéria de uma das fases na forma finamente dividida (sólido, líquido ou gás), denominada fase dispersa, misturada à fase contínua (sólido, líquido ou gás), denominada meio de dispersão. As soluções de macromoléculas são misturas homogêneas e também são consideradas colóides já que a dimensão das macromoléculas está no intervalo de tamanho coloidal e, como tal, apresentam as propriedades características dos colóides (JUNIOR; VARANDA, 1999).

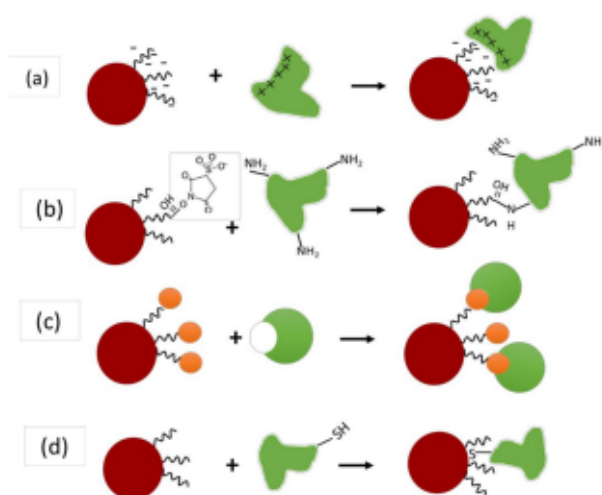
O termo colóide foi introduzido por Thomas Graham (1861) considerado o pai da Química dos Colóides, (do grego “kolla” + sufixo “oide”, “similar a”) e referia-se originalmente a materiais em suspensão aquosa que possuíam baixa difusibilidade e eram incapazes de atravessar uma membrana de diálise. Mais tarde, em 1857, o termo passou a ser atribuído à Michael Faraday, durante apresentação de seu trabalho sobre os efeitos da luz sobre suspensões coloidais aquosas de ouro metálico (FILHO; SERRA, 2015). Isto porque os sistemas coloidais quando atravessados por um feixe de laser espalham ou dispersam a luz deixando um rastro através do líquido na solução (CUNHA, 2020).

As nanopartículas podem ser sintetizadas através de uma variedade de métodos utilizando apenas um metal precursor, um agente redutor e/ou estabilizador que permite o ajuste fácil das propriedades ópticas (KONG et al, 2017). O ouro coloidal preparado a partir de sínteses clássicas se apresenta na cor vermelho-rubi com partículas de diâmetro médio em torno de 20 nm. A coloração na reação inicial e final pode variar entre o cinza, azul e roxo o que

se observa proporcional ao tamanho das nanoestruturas. Tal fato se dá, devido à oscilação coletiva dos elétrons livres nas partículas induzidos por um campo eletromagnético denominado Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (MILANEZE, 2015). As características espectrais da ressonância de plasmon estão associadas ao tamanho, formato e ao meio em que estão constituídas as NPs (SILVA, 2015).

O crescente interesse no uso das nanopartículas de ouro em nanomedicina decorre das inúmeras possibilidades de funcionalização e estratégias de projeção dessas nanoestruturas complexas com reconhecimento preciso de cadeias de DNA, interações antígeno-anticorpo e outros sistemas de biorechecimento (STOBIECKA, HEPEL, 2011). As NPAus apresentam a capacidade de ligar-se a biomoléculas e tal característica tem sido explorada em muitos processos materiais de interesse médico (PEREIRA, ZANONI, UGO, 2007). Esta ligação que une as nanopartículas a essas biomoléculas pode ocorrer de diferentes formas, seja por adsorção eletrostática, pela conjugação do ligante na superfície da NP, pela conjugação a uma pequena molécula de cofator ao qual a proteína se liga ou por conjugação direta à superfície da nanopartícula, conforme a Figura 1.

Figura 1 - Estratégias diversas para conjugação de NPs. a) adsorção eletrostática de uma proteína; b) ligação covalente ao ligante da AuNP; c) conjugação de um cofator de proteína à AuNP; d) a conjugação direta de uma aminoácido à superfície da AuNP.



Fonte: RAZAK et al. (2017)

A conjugação de compostos à nanopartícula oferece diversas possibilidades podendo ser empregada para melhorar a carga de superfície, diminuir a imunogenicidade, diminuir a agregação e aumentar a estabilidade, melhorar a captação celular ou a atuação ativa em células-alvo (JAZAYERI, 2016).

O National Cancer Institute dos EUA definiu nanopartículas (NPs) como partículas coloidais na faixa de tamanho entre 1–100 nm (JAHANGIRIAN et al, 2019). Estudos sugerem que NPs com diâmetro aproximado de 100 nm parecem se acumular de maneira satisfatória em tumores sólidos e são retidas em altas concentrações devido ao maior efeito de permeabilidade e retenção (EPR, Enhanced Permeability and Retention) amplamente associada à estrutura intrínseca dos vasos sanguíneos tumorais (CHUNG et al., 2005; LI et al., 2016; JAHANGIRIAN et al., 2019). Observa-se, contudo que, a largura entre as células endoteliais em vasos sanguíneos tumorais é de 200 nm a 1,2 µm, portanto, drogas em nanoescala podem se extravasar e difundir-se nestes vasos e não em vasos sanguíneos saudáveis; além disso, tais vasos com calibre excessivo têm pressão intersticial do fluido dentro dos tumores aumentada e isto faz com que o líquido intersticial extravase do tumor para tecidos circundantes, resultando na disseminação do material às células tumorais e na necessidade de baixas concentrações do agente terapêutico (LI et al., 2016).

Todas essas características fazem com que, potencialmente, as nanopartículas de ouro quando associadas a uma molécula de direcionamento com atividade antitumoral atue significativamente no prognóstico e tratamento do câncer, minimizando o dano e o comprometimento de células saudáveis (JAHANGIRIAN et al, 2019).

Resultados experimentais em modelos animais mostram que, NPs de tamanho menor que 150 nm, carga neutra ou levemente negativa, têm a capacidade de se mover através dos tecidos tumorais; nanopartículas na faixa de tamanho entre 50 e 100 nm e uma carga quase neutra podem penetrar em tumores grandes após administração sistêmica (JAHANGIRIAN et al, 2019). Algumas características como tamanho, carga, morfologia e funcionalização estrutural devem ser estudadas (PIELLA, BASTUS, PUNTES, 2016).

Chan et al. relataram que a captação celular é igualmente dependente do tamanho das nanopartículas, utilizando AuNPs variando em tamanho de 2-100 nm revestidas com Herceptin em células de mama mediada pelo receptor HER2 observou eficiência maior na captação celular de partículas na faixa de 20 a 50 nm e ativação da apoptose de partículas com tamanho entre 40 e 50 nm (DUNCAN, KIM, ROTELLO, 2010).

Como estratégia terapêutica do câncer o direcionamento das NPAUs pode ser alcançado de forma passiva, quando as nanopartículas acumulam-se no interior do tumor extravasando-as pelos vasos sanguíneos alterados pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR); ou ainda podem ser direcionados para tipos celulares específicos, receptores ou proteínas via ligantes como anticorpos, proteínas, peptídeos, aptâmeros e pequenas moléculas (MIESZAWSKA et al, 2013). Algumas drogas hidrofóbicas são conjugadas à nanopartículas através de ligações não-covalentes não necessitando necessariamente de modificações estruturais do complexo para liberação do fármaco. Em outros casos, drogas podem ser conjugadas covalentemente através de ligações cliváveis sendo o fármaco liberado por estímulos internos ou externos (ROTELO, KIM, DUNCAN, 2010).

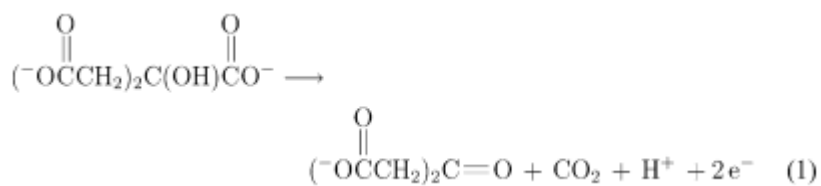
Vários fármacos conjugados à nanopartículas de ouro e ferro já foram estudados como sistemas de administração de medicamentos, como a cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, epirubicina, 5-fluorouracil (5-FU), ácido fólico (FA), doxorubicina (DOX), paclitaxel (PTX) e daunorrubicina (Dau) (JAHANGIRIAN et al, 2019). A presença de seis elétrons livres nas NPAUs favorece a ligação da partícula a tióis e aminas, podendo ser facilmente marcadas com proteínas e moléculas ricas em aminoácidos o que pode ser uma vantagem no direcionamento com intuito terapêutico (RAZAK, 2017)

2.1.1. Síntese de Nanopartículas de Ouro via Redução com Citrato de Sódio

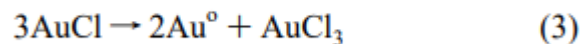
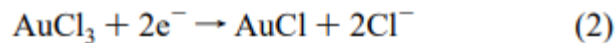
As nanopartículas de ouro foram produzidas pela primeira vez em 1857 por Faraday e colaboradores, a partir da redução do cloreto de ouro III pelo fósforo e estabilização por dissulfeto de carbono (GUO et al, 2017). Posteriormente, em 1951, Turkevich e colaboradores, a partir da modificação

de Hauser e Lynn (1940) desenvolveu a síntese de nanopartículas mais recorrentemente utilizada: redução de Au³⁺ a Au⁰ do ácido tetracloroáurico por meio de citrato de sódio, dando origem a nanopartículas esféricas monodispersas (TURKEVICH et al., 1951; JR et al., 2012; GUO, et al., 2017).

A reação de obtenção das nanopartículas de ouro através da redução por citrato de sódio pode ser dividida em três etapas paralelas apresentadas por Kumar (2007). A primeira consiste na oxidação de citrato formando dicarboxi acetona, conforme equação 1.

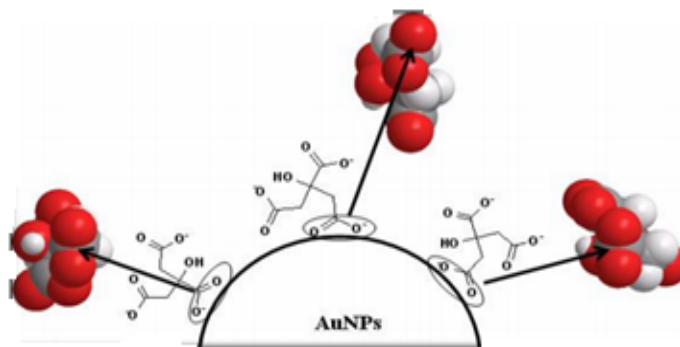


A segunda etapa consiste na redução do sal áurico em sal auroso, conforme equação 2, que se dissocia em átomos de ouro metálico (equação 3).



O ouro metálico se aglomera para a formação das NPs, sendo estabilizadas pela acetona dicarboxi, não diretamente do citrato de sódio em solução (QUINTÃO, 2014). Os íons citrato atuam tanto na redução quanto na estabilidade do colóide evitando sua agregação, em virtude da alta densidade de carga negativa pelos grupos carboxilas ancorados na superfície (SILVA, 2016). (figura 2).

Figura 2 - Estrutura da nanopartícula de ouro. Ancoragem de íons pela adição de citrato de sódio na interface da partícula formada promovendo a estabilização.



Fonte: modificado de SILVA (2016).

A síntese da NP ocorre pelas etapas de nucleação e crescimento, a fase de nucleação pode ser definida como o processo inicial de redução do ouro, em que os átomos reduzidos colidem, formando um núcleo estável e dando origem a uma nova fase ao sistema até então homogêneo (MILANEZE, 2015).

A etapa de crescimento que confere tamanho a nanopartícula previamente formada consiste em um processo adicional à nucleação, onde ocorrem depósitos de materiais sobre a partícula, de modo que esta aumenta de volume. Em alguns casos pode ocorrer o processo de agregação, que se dá quando o colóide não é estável o suficiente, com baixa repulsão, favorecendo a agregação (MILANEZE, 2015).

Algumas modificações ao método foram propostas por FRENS et al. (1973) que observou o efeito da variação da quantidade do agente estabilizador indicando que a variação na quantidade de citrato afeta as rotas de cristalização das nanopartículas e que, dependendo de sua quantidade em solução, existem duas possíveis rotas de obtenção. A primeira, observada por Turkevich et al. (1951), ocorre em presença de maior quantidade de íons citrato, frente seu caráter como agente estabilizante. Neste caso, as partículas são nucleadas mais lentamente e, em seguida, crescem do mesmo modo (PALMA, 2017). Contudo, no meio onde há menor quantidade de citrato a nucleação ocorre de maneira mais rápida e, devido à baixa quantidade de íons citrato para estabilizar as NPs, ocorre a agregação do ouro, sendo formadas

inicialmente estruturas em nanofios que são maturadas em nanopartículas de formato esférico conforme os íons AuCl_3^- se tornam escassos no meio. Essa rota promove, em geral, melhor estabilidade das partículas, as quais sofrem variação de tamanho dependendo da concentração do agente redutor (PALMA, 2017).

2.1.2. Síntese de Nanopartículas de ouro via Redução por Aminoácidos

A versatilidade das nanopartículas de ouro provém, em grande parte, às suas propriedades exclusivas de ressonância plasmônica de superfície (SPR), que vão depender de seu tamanho e forma. Entretanto, para redução do tamanho e controle da morfologia das NPs, a maioria dos protocolos requer o uso de solventes como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), tolueno, citrato de sódio, borohidreto de sódio ou outros compostos orgânicos pouco compatíveis à utilização como fármaco (YANG; HUANG, 2014). A presença de remanescentes químicos no produto final compromete aplicações biomédicas e o uso de peptídeos na síntese das nanopartículas metálicas surge como alternativa biocompatível à síntese química (TAN, LEE, WANG, 2010).

Os aminoácidos apresentam grupos laterais reativos, que em meio aquoso, tornam-se íons dipolares, agindo como ácidos (doadores de prótons) ou bases (receptores de prótons). Desta forma, os aminoácidos são capazes de reduzir íons de ouro, prata, ferro e outros. Os grupos amina e carboxila dos aminoácidos na superfície das nanopartículas estabilizam-nas em suspensão, além de ancorá-las virtualmente a qualquer superfície biológica por meio de interações polivalentes (SILVA et al, 2017).

Diversos estudos têm demonstrado o uso de aminoácidos como agentes redutores na síntese do ouro coloidal. Selvakannan et al. (2004), observou a formação das nanopartículas de ouro pela redução por triptofano sob aquecimento a 50°C dada a reação do grupamento indol do aminoácido ligado à superfície das partículas (SELVAKANNAN et al, 2004).

Zarabi et al. (2014), reportou estratégias de síntese de NPaus utilizando os aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico e triptofano sob ebulição, estabilizando as nanopartículas obtidas em SDS (sódio dodecil sulfato) (ZARABI et al, 2014).

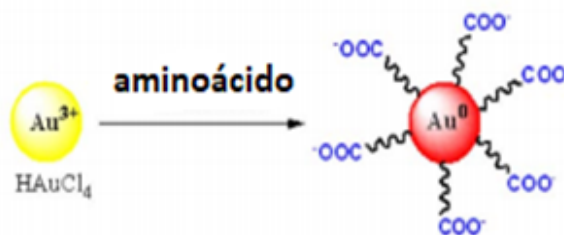
Por sua vez Cai e Yao (2014) obteve nanopartículas de ouro a partir de aspartato, glicina, leucina, lisina e serina obtidas por irradiação UV (Cai, Yao, 2014). Maruyama, Fujimoto e Maekawa (2015) demonstraram a obtenção de nanopartículas de ouro utilizando 11 tipos de aminoácidos em reação a frio, atendo-se a análise das condições de síntese pelo aminoácido L-histidina (MARUYAMA; FUJIMOTO; MAEKAWA, 2015).

Os aminoácidos são constituídos por um grupo funcional ácido carboxílico (-COOH), um grupo amino (-NH₂) e um hidrogênio (-H) ligados ao átomo de carbono- α central. A cadeia lateral R variável se associa ao carbono- α formando uma estrutura tetraédrica ou assimétrica, com exceção ao aminoácido glicina em que o grupo-R é o hidrogênio (VOET, 2000). Os aminoácidos se ligam à superfície das nanopartículas através do grupamento amina e seus grupos carboxílicos se estendem na tentativa de estabilizar as partículas (KAI, YAO, 2014) (Figura 3).

Devido à presença de grupos carboxílicos, as nanopartículas formadas por aminoácidos são adequadas à ligação com proteínas. Muitos grupamentos amina em proteínas se unem por interação iônica com os ácidos carboxílicos na superfície da partícula, formando um complexo estável (ZARABI et al, 2015).

O aminoácido L- arginina pode ser utilizado na reação na tentativa de formar uma camada estável ao redor da nanopartícula facilitando a ligação com proteínas e peptídeos ou ser empregada como agente redutor, embora seu mecanismo de síntese não esteja completamente elucidado. O aminoácido L-arginina (Ácido 2-amino-5-guanidino-pentanóico ou Ácido 2-amino-5-diaminometilideno-amino pentanóico) possui além do grupamento amina e ácido carboxílico, um grupo guanidina fortemente básico (TOMOIA, 2011).

Figura 3 - Representação da formação de NP pela reação com o aminoácido
Ancoramento do grupo carboxila na superfície da partícula.



Fonte: modificado de Wangoo, Suri, Shekhawat, (2008).

2.2. PROPRIEDADES ÓPTICAS E ESTRUTURA QUÍMICA

2.2.1. Ressonância Plasmon de Superfície

As propriedades ópticas das soluções coloidais estão fortemente associadas ao tamanho, forma geométrica e o meio circundante que influencia diretamente na interação entre luz e partícula (PEREIRA, 2009). Tal interação baseia-se no comportamento dos plasmons de superfície, entendidos como ondas provenientes da oscilação coletiva de cargas ou a oscilação dos elétrons da superfície dos metais. Contudo, a frequência de ressonância está relacionada com a atração eletrostática que contribui para formação do plasmon e pelo tamanho da partícula, desta forma, quando o tamanho da partícula se altera observa-se a mudança de cor (BONIFÁCIO, 2006).

As nanopartículas de ouro absorvem luz em um dado comprimento de onda, o que resulta na emissão de luz de comprimento de onda complementar. As nanoesferas de ouro, por exemplo, tipicamente com 40 nm absorvem luz verde a 520 nm e produz luz vermelha complementar, conforme Figura 4 (RAZAK et al. 2017).

Figura 4 - Relação entre o comprimento de onda, absorvância e cor.

Wavelength (nm)	Absorbed color	Complementary color
650–780	Red	Blue-green
595–650	Orange	Greenish blue
560–595	Yellow-green	Purple
500–560	Green	Red-purple
490–500	Bluish green	Red
480–490	Greenish blue	Orange
435–480	Blue	Yellow
380–435	Violet	Yellow-green

Fonte: RAZAK et al. (2017)

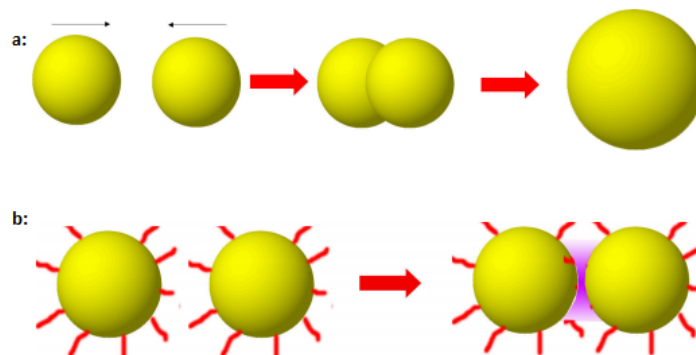
Mudanças sensíveis no meio dielétrico promovem significativas alterações na ressonância dessas estruturas (PRADO, 2014). Mie foi o primeiro a elucidar a origem das cores do colóide e sua teoria foi posteriormente complementada com os modelos de Maxwell-Garnett que explicavam diversos fenômenos classificando a luz como sendo uma onda eletromagnética traduzida como oscilações de campos elétricos e magnéticos perpendiculares entre si em função do tempo e sua interação (SANTOS 2016).

A teoria de Mi parte do pressuposto de que não existe nenhuma interação entre partículas na solução coloidal. No entanto, quando as partículas não possuem camada de passivação eficiente que garanta que se estabilize eletrostaticamente, o fenômeno da agregação pode ser observado, graças à geração de um campo elétrico evanescente que ocasiona ressonâncias em energias menores, gerando absorvância no intervalo de 650 nm. Dá-se o nome de agregação quando duas partículas ou mais se aproximam o suficiente para que ocorra a interferência dos campos evanescentes, mas sem se fundirem (BONIFÁCIO, 2006).

No processo de fusão ocorre a união de duas ou mais partículas formando uma partícula de tamanho maior e, neste caso, não se observa

banda de absorção em 650 nm e sim o deslocamento do máximo de absorção correspondente a ressonância plasmônica com amplitude do pico (BONIFÁCIO, 2006) (Figura 5).

Figura 5 - Processo de fusão e agregação durante a etapa de crescimento da partícula. Em a) processo de fusão entre duas partículas; b) processo de agregação.



Fonte: Bonifácio (2006)

2.2.2. Espalhamento Dinâmico de Luz, Diâmetro Hidrodinâmico e Polidispersidade

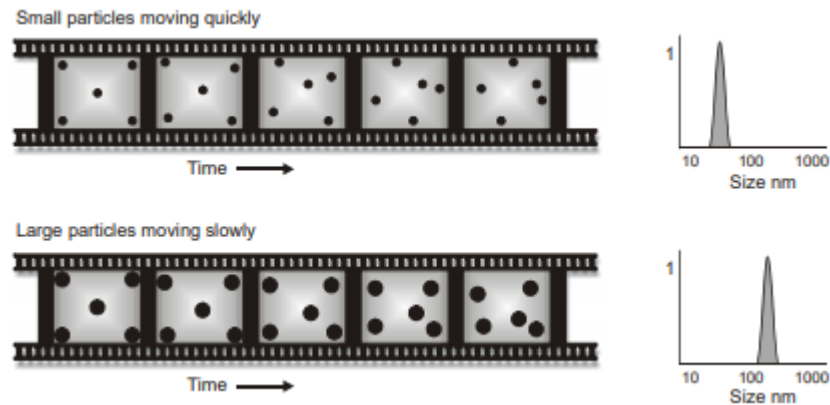
O espalhamento dinâmico de luz, do inglês Dynamic Light Scattering (DLS), consiste na técnica de caracterização de tamanho a partir da medição da luz dispersa em função do tempo através de um feixe de laser (SANTOS, 2013). As partículas em solução movem-se aleatoriamente e sua velocidade de movimento é utilizada como dado para determinar seu tamanho, a análise se baseia no movimento Browniano em solução, em que as partículas maiores se movem mais lentamente e dispersará mais luz do que partículas menores (SANTOS, 2013; MALVERN, 2013) (Figura 6). É chamado de movimento browniano, o movimento aleatório de partículas em um líquido devido ao bombardeio pelas moléculas que os cercam. A relação entre o tamanho da partícula e sua velocidade em virtude do movimento browniano é definida pela equação de Stokes-Einstein (MALVERN, 2013).

Para o cálculo do diâmetro efetivo (D_{ef}) ou hidrodinâmico das partículas em equilíbrio térmico com o solvente, temos:

$$D_{ef} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_T}$$

Sendo k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura e η , a viscosidade do solvente. A equação atenta-se ao diâmetro da partícula associada a contra-íons (NOMURA et al, 2013).

Figura 6 - Movimento browniano entre moléculas pequenas e grandes, respectivamente, gerando gráficos de distribuição de tamanho pela intensidade de espalhamento de luz. Partículas menores se movem mais rapidamente e dispersam menos luz; partículas maiores se movem mais lentamente e espalham mais luz gerando um pico tardio correspondente a um tamanho maior.



Fonte: MALVERN (2013)

2.2.3. Potencial Zeta e Estabilidade Coloidal

O potencial zeta é o principal parâmetro no controle de interações eletrostáticas e estabilidade em dispersões coloidais (KASZUBA et al, 2010).

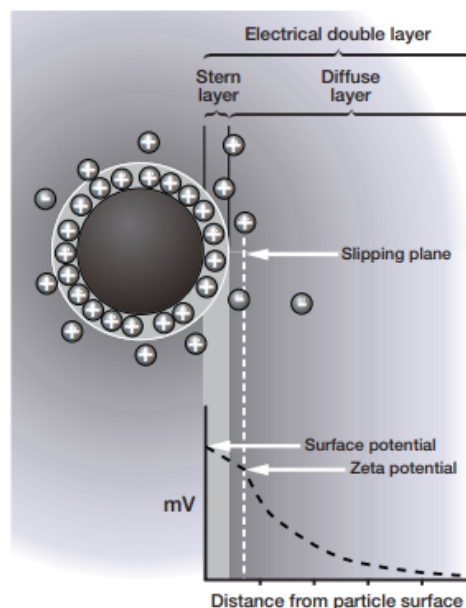
Em uma dada solução coloidal, se todas as partículas em suspensão tiverem um grande potencial zeta negativo ou positivo, elas tenderão a se repelir e não haverá tendência à floculação. Entretanto, se as partículas tiverem baixos valores de potencial zeta, não haverá força suficiente para impedir que as partículas se unam e floculam é estabelecido que a linha divisória geral entre suspensões estáveis e instáveis é geralmente obtida entre valores positivos ou negativos de 30 mV. Partículas com potencial zeta mais positivo

que (+ 30mV) ou mais negativo que (-30mV) são normalmente consideradas estáveis (MALVERN, 2013)

As dispersões coloidais em meio aquoso possuem cargas superficiais e íons em solução formando um gradiente de potencial elétrico ao redor. Um aumento na concentração desses contra-íons próximos à superfície resulta na formação de uma dupla camada elétrica, dividida entre outras duas – a camada interna, mais próxima do colóide, denominada camada Stern, onde os íons estão fortemente ligados e a camada externa – camada difusa, onde os íons estão menos firmemente associados (Figura 7). Devido ao movimento browniano, as partículas carregam consigo certa camada líquida composta por íons que gera interação eletrostática, formando uma região denominada plano de escorregamento (do inglês, *slipping plane*). O potencial elétrico no limite deste plano é chamado de potencial zeta (KASZUBA et al, 2010).

Duas forças regem as interações entre partículas a própria interação eletrostática, de caráter repulsivo e as forças de Van der Waals (atrativas). Para se obter um colóide estável é necessário, portanto, que as forças eletrostáticas superem as forças de Van der Waals, impedindo que as partículas floculem (PALMA, 2017).

Figura 7 - Esquema de distribuição de contra-íons e camadas elétricas ao redor de uma partícula em solução.



Fonte: MALVERN, (2013)

2.3. O CÂNCER E OS RECEPTORES INTEGRINA

O câncer é uma doença multifatorial associada a altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (BREGOLI et al, 2016). É considerada a segunda causa de morte em países desenvolvidos. A estimativa mundial mostra que, em 2012, ocorreram 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de óbitos (INCA 2019). As abordagens mais comuns de tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia ou a associação de alguma dessas intervenções, as quais em sua maioria podem ocasionar efeitos colaterais deletérios, como toxicidade sistêmica e imunossupressão, danos psicológico, emocional e estético (PILLAI, 2019).

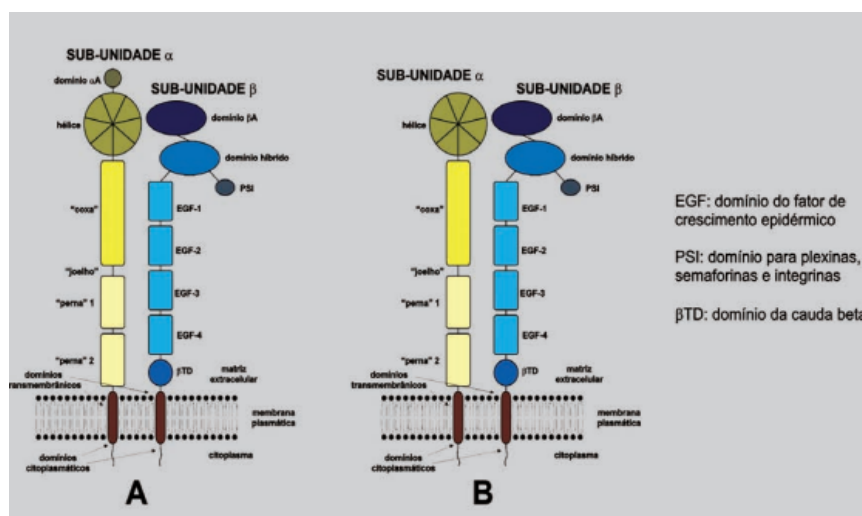
No uso de quimioterápicos os efeitos colaterais se devem principalmente à falta de seletividade do agente terapêutico e a distribuição indiscriminada de medicamentos, dado seu perfil farmacocinético indesejado que resulta em baixas concentrações do fármaco dentro do tumor podendo gerar resistência e tolerância ao fármaco, ao mesmo tempo, afetando células saudáveis circundantes, contudo o tratamento bem-sucedido é, portanto, dependente da entrega específica e suficiente da droga ao citosol ou ao núcleo das células malignas (SELBO, 2010).

As integrinas são uma família de receptores heterodímeros transmembrana constituídos por duas subunidades, α e β presentes em diversos tipos celulares (GAGEN et al., 2013). Até o momento foram descritos dezoito tipos de subunidades α e oito tipos de subunidades β que, combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas distintas presentes nas células de mamíferos (XIONG et al., 2001).

O contato entre as subunidades α (150 a 180 KD) e β (~90 KD) se dá através de suas porções amino-terminais que, juntas, formam uma “cabeça” globular e as porções remanescentes formam duas caudas em formato cilíndrico que transpassam a membrana plasmática, na qual ambas as subunidades apresentam um pequeno domínio transmembrana de 20 a 30 resíduos e uma região intracelular de 20 a 50 resíduos. Existem dois tipos

principais de integrinas, aquelas cujo, a subunidade α contém uma região extra de ~180 aminoácidos chamada de domínio α -A que interage com íon metálico e aquelas em que o domínio extra encontra-se ausente, assim como as que possuem domínio β extra (β -A), ambos relacionados a ligação com o ligante (SILVA et al, 2007).

Figura 8 - Representação estrutural das subunidades α e β das integrinas. Estrutura das subunidades α e β das integrinas existentes em duas classes diferentes: uma com um domínio α -A adicional na subunidade α (**A- lado esquerdo**) e outra sem o domínio α A na subunidade α (**B – lado direito**).



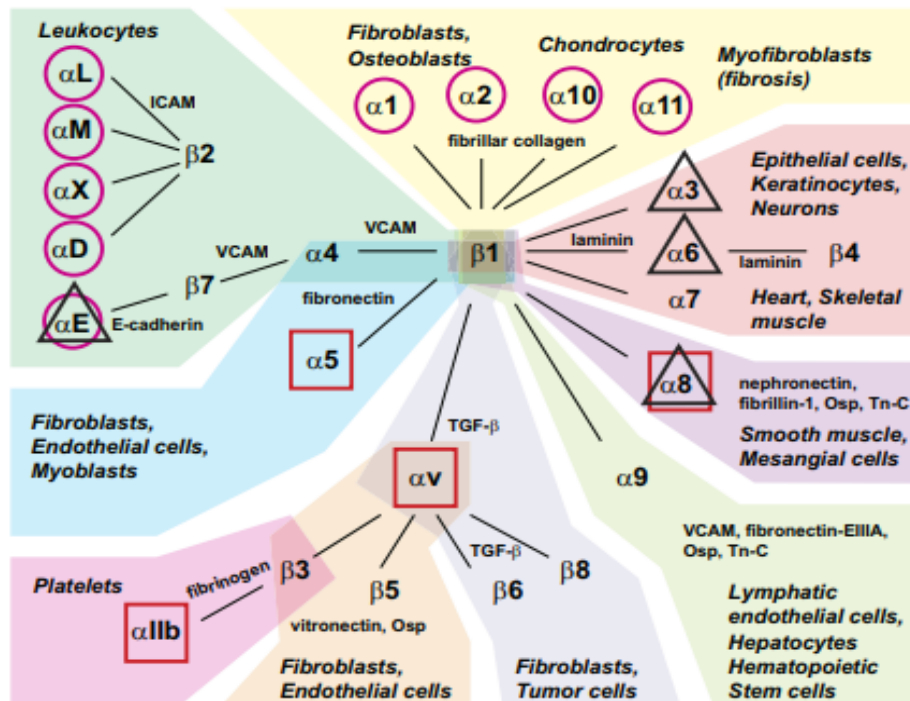
Fonte: SILVA et al, (2007)

As integrinas atuam como intermediadoras na comunicação entre o citoesqueleto celular e proteínas plasmáticas e matriz extracelular através da adesão célula-a-célula por meio da interação com outras proteínas de membrana (BONET; HERNANDEZ, 2014). Fornecem interação física com a matriz extracelular necessária para a adesão, migração e posicionamento celulares e a indução de eventos sinalizadores necessários para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, além disso, são mediadoras da adesão celular e reguladoras da angiogênese e da homeostasia vasculares (SILVA et al., 2007).

Uma integrina pode ligar-se a múltiplos ligantes e diferentes integrinas podem ligar-se ao mesmo ligando e desencadear ou não respostas diferentes. A integrina $\alpha 5 \beta 1$ e $\alpha V \beta 6$, por exemplo, se ligam à fibronectina, mas ocasionam

respostas diferentes (PAREJO, STUPP, RUEEG, 2019) (Figura 9).

Figura 9 - Receptores integrinas nos diversos tipos celulares. Expressão de receptores integrinas, características estruturais, seus ligantes e sua expressão tecidual e celular.



Fonte: BACHMANN et al, (2019)

Num processo chamado de sinalização “de fora para dentro” as integrinas transmitem sinais para o interior da célula através de seus domínios citoplasmáticos. Os domínios da subunidade β conectam-se a filamentos de actina do citoesqueleto por meio de proteínas intracelulares como talina, vinculina e α -actinina e nesse processo, regulam a organização do citoesqueleto, ativam cascatas de quinases sinalizadoras e modulam o ciclo celular (XIONG et al, 2002; SILVA, 2007).

As integrinas podem ser classificadas de acordo com suas características estruturais, seus ligantes e sua expressão tecidual e celular (BACHMANN et al, 2019). Algumas integrinas são expressas constitutivamente e são produzidas normalmente em condições fisiológicas, outras possuem regulação diferenciada e respondem a estados de ativação celular, como por exemplo, na presença de citocinas angiogênicas VEGF e TGF β (SILVA, 2007).

A família das integrinas β 3 (CD61) consiste dos receptores: α IIb β 3 (CD41/CD61) encontrado em plaquetas e megacariócitos e α v β 3 (CD51/CD61), mais amplamente distribuído. A integrina α IIb β 3 possui afinidade maior pelo fibrinogênio e está envolvida nos mecanismos de hemostasia, o bloqueio da agregação plaquetária pelo antagonismo da integrina α IIb β 3 constitui importante estratégia terapêutica (SILVA, 2007).

A integrina α v β 3, também conhecida como receptor de vitronectina, consiste em uma subunidade α v de 125 kDa e uma subunidade β 3 de 105 kDa. A integrina α v β 3 liga-se a inúmeras moléculas da Matriz Extracelular com um motivo de péptido triplo ArgGly-Asp denominado (domínio RGD) que inclui a fibronectina, fibrinogênio, fator von Willebrand e formas proteolisadas de colágeno e laminina. A α v β 3 é responsável por inúmeros processos, como reabsorção óssea mediada por osteoclastos, angiogênese e neovascularização patológica e metástase tumoral (LIU, WANG, CHEN, 2008).

As proteínas de adesão, embora estruturalmente distintas, requerem seqüências de reconhecimento semelhantes para se ligarem às integrinas. Essas proteínas possuem em comum um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico exposto, geralmente, em dobras estendidas e flexíveis das seqüências de aminoácidos que contêm ácido aspártico capazes de se ligarem às integrinas, a mais estudada delas é a seqüência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Várias proteínas adesivas, como laminina, fibronectina, vitronectina, fibrinogênio e colágeno, contêm a seqüência RGD e podem ter sua interação com as integrinas inibida por antagonistas desses ligantes (SILVA et al, 2007).

A integrina α v β 3 é altamente expressa e regulada por células endoteliais ativadas durante o processo de angiogênese tumoral, mas não em células endoteliais quiescentes, sendo portanto a α v β 3 considerada um importante marcador molecular e um interessante alvo para sistemas de direcionamento de carreadores e drogas (LIU, WANG, CHEN, 2008; CHEN, NIU, CHEN, 2016).

Angiogênese tumoral é o termo que se dá a formação de novos vasos sanguíneos pré-existentes, essencial para o crescimento, invasão e metástase do tumor (DEMIRCIUGLU; DILKE, 2016). Na ausência da neovascularização no transporte de oxigênio e nutrientes, os tumores sólidos em geral não crescem além de 1 a 2 mm (CHEN, NIU, CHEN, 2016).

A interação entre células cancerígenas e matriz extracelular é essencial. As células cancerígenas interagem com células adjacentes e com proteínas da MEC, a fim de proliferar e migrar para diferentes tecidos e se estabelecer formando um novo tumor (RIVAS-MERCADO; GARZA-OCANÃS, 2017).

Em metástase, as integrinas agem como mediadoras na adesão de células tumorais à MEC e na degradação proteolítica da MEC por metaloproteases para invasão tecidual, além disso, induzem a migração de células tumorais pela ativação da via PI3k / Akt (MONTENEGRO et al, 2012).

Relata-se alta expressão de integrina $\text{Av}\beta 3$ em osteossarcomas, neuroblastomas, carcinomas de pulmão, mama, próstata e bexiga, glioblastomas e melanomas invasivos. Evidências clínicas e pré-clínicas indicam que as integrinas vasculares podem ser alvos terapêuticos válidos e que a inibição da função da integrina $\alpha\beta 3$ suprime eficientemente a angiogênese e inibe a progressão tumoral (SILVA et al, 2007). Normalmente as integrinas $\alpha\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha\beta 6$ são geralmente expressas em níveis indetectáveis na maioria dos epitélios adultos e tem sua expressão aumentada em alguns tumores. Os níveis de expressão das integrinas $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha\beta 6$ estão correlacionados com a progressão agressiva de vários tumores, em particular a integrina $\alpha\beta 3$, altamente expressa em glioblastoma, melanoma, tumor de ovário, câncer de mama e próstata, e em formações metastáticas (ARÓSIO; CASAGRANDE; MANZONI, 2012).

2.3.1. Desintegrina

As desintegrinas são uma família de proteínas de baixo peso molecular de 4-15 kDa ricas em cisteínas encontradas em venenos de algumas espécies de serpentes que bloqueiam seletivamente as integrinas atuando de maneira anti-metástase, anti-angiogênese, anti-proliferativa e indutora de apoptose (RIVAS-MERCADO; GARZA-OCANÃS, 2017.) São polipeptídeos derivados por processamento proteolítico de precursores de metaloproteinase e que carregam o motivo de reconhecimento das integrinas (RGD, KGD, WGD, VGD, MGD, RTS, KTS) subdivididos em quatro grupos. O primeiro grupo com 41-51 aminoácidos estruturados em 4 pontes de cisteína, por exemplo, a Echistatina –RGD; obstustatina – KTS. O segundo grupo, com cerca de 70 aminoácidos,

estruturadas por 6 pontes de cisteína (por exemplo, barbourina-KGD, flavoviridina-RGD e atrolisina E-MVD); o terceiro grupo inclui desintegrinas com cerca de 84 resíduos estruturados por sete pontes de cisteína (por exemplo, bitistatina-RGD) e o quarto grupo representa complexos macromoleculares formados por homodímeros ou heterodímeros ligados normalmente através de ligação covalente com aproximadamente 67 aminoácidos e dez cisteínas (LAZAROVICI; MARCINKIEWICZ; LELKES, 2019).

Diversas desintegrinas contêm a sequência do motivo RGD ou KGD que atua como um antagonista potente das integrinas $\beta 1$ and $\beta 3$, em particular, integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$ e $\alpha v\beta 3$ (MONTENEGRO et al, 2012).

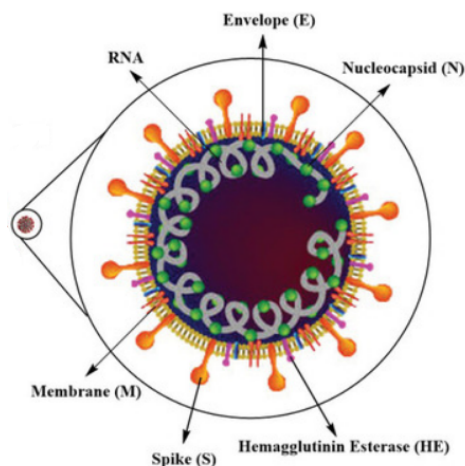
A Echistatina, antagonista da integrina $\alpha v\beta 3$, foi descrita em 1991 e isolada da serpente *Echis carinatus*. O antiplaquetário Aggrastat® disponível atualmente no mercado, foi desenvolvido a partir da echistatina isolada desse veneno (RIVAS-MERCADO; GARZA-OCANÑAS, 2017).

2.4. COVID-19 E O VÍRUS SARS-CoV-2

Os Coronavírus pertencem à família de vírus Coronaviridae, que inclui os gêneros Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus. São uma família de vírus envelopados de RNA fita simples positivo, com tamanho aproximado de 27-32kb, o nome “corona” remete a sua aparência - corona solis (corona em latim significa “coroa”). O SARS-CoV-2, pertencente a esta classe, é o vírus causador da COVID-19, detectado pela primeira vez na China, em dezembro de 2019 (HOSSAIN, 2021).

O vírus SARS-CoV-2 é constituído por cinco proteínas estruturais, que incluem glicoproteínas spike (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N). As proteínas N, M, S e E estão presentes em todos os vírions, enquanto a proteína hemaglutinina esterase (HE) está presente apenas em alguns β -coronavírus (DOUSARI; MOGHADAM; SATARZADEH, 2022). (figura 10). Estruturalmente apresenta ainda uma cauda C-terminal curta localizada dentro do virion (SYNOWIEC et al, 2021).

Figura 10 - Estrutura do vírus SARS-CoV-2



(Dousari; Moghadam; Safarzadeh, 2022) modificado

Dentre as proteínas estruturais do vírus, o principal alvo para o desenvolvimento da vacina contra a COVID-19 é a utilização da glicoproteína Spike, que através do domínio de ligação ao receptor celular (RBD) interage

com a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) do hospedeiro. O uso de nanopartículas como um sistema de entrega de antígeno e imunização vem recebendo grande atenção (BUDEL, 2022).

A partir da complexação de nanopartículas metálicas à proteínas é possível a criação de “vírus artificiais” com o potencial de congregar diferentes capacidades funcionais o que tem gerado promissoras expectativas na área de vacinas e terapias avançadas (FERRANDO et al, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro, de forma a obter partículas metálicas biocompatíveis e eficientes para carrear proteínas com atividade antitumoral, *via* direcionamento pela desintegrina Echistatina, e como carreadoras de proteínas virais de SARS-COV 2 para indução de anticorpos em estratégias vacinais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese de AuNPs *via* redução por citrato de sódio e aminoácidos: Escolha do melhor aminoácido e condições de síntese para obtenção de AuNPs com tamanho aproximado de 40 nm;
- Caracterização e identificação da AuNPs por DLS e potencial zeta;
- Análise da eficiência de conversão na reação de síntese por espectrofotometria UV-vis;
- Padronização da síntese garantindo reprodutibilidade;
- Ensaio de interação e caracterização dos complexos formados de NPAu-GFP-Echistatina (desintegrina) e NPAu-C-terminal (SARS-COV2);
- Estudos de transfecção em linhagens tumorais;
- Ensaio de adsorção dos complexos formados;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

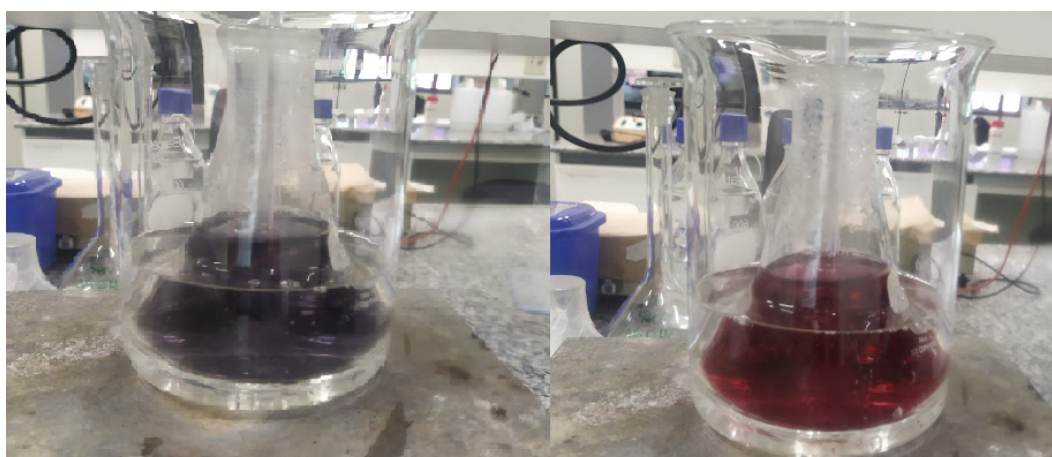
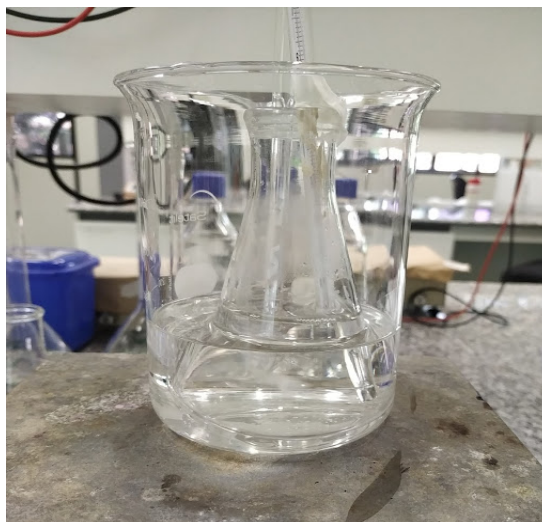
4.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.1.1. Síntese de NPAus via redução por Citrato de Sódio

A síntese da nanopartícula de ouro (método de ordem de adição direta) desenvolvido por Turkevich e colaboradores (2015) foi realizada inicialmente como síntese comparativa (controle), uma vez que PALMA e colaboradores (2017) já haviam feito o estudo deste método em nosso laboratório e verificado a razão molar citrato:ouro mais adequada para obter partículas de tamanho médio de cerca de 40 nm. Com as modificações propostas por Sivaraman, Kumar e Santhanam (2011), posteriormente, com algumas modificações das duas técnicas, o método de síntese de Turkevich passou a ser utilizada como solução teste dos experimentos utilizando as proteínas estruturais da SARS-COV 2.

Baseado em experimentos, foram utilizados 95 mL de solução de cloreto de ouro III triidratado (Sigma Aldrich) a 0,27 mM em erlenmeyer aquecido em banho-maria em óleo de silicone, sob agitação e temperatura constantes em agitador mecânico Tecnalab® (Figura 10). Depois de aquecida até ebulição (98°C) foi adicionada imediatamente à solução 5,0 mL de citrato de sódio a 6,8 mM mantendo as mesmas condições de temperatura e agitação até o final da reação. Os parâmetros de temperatura e agitação utilizados inicialmente foram: agitação: 10; temperatura: 90°C. Após cerca de 5 minutos houve o início da mudança de cor da solução levemente amarelada estabilizando-a em vermelho-rubi nos 15 minutos finais de reação, com posterior bloqueio da reação em banho de gelo.

Figura 11 – Síntese de NPAu através do método de Turkevich realizada neste trabalho.



Coloração da solução coloidal de ouro vermelho rubi nos 15 minutos finais de reação.

Fonte: este trabalho

Uma vez que os parâmetros de agitação do equipamento utilizado não possuía mensuração em rpm ou g, a fim de garantir a reprodutibilidade das sínteses foram testadas algumas modificações. Uma delas em relação à mudança do esquema agitação. Neste experimento foi utilizado o agitador magnético IKA 20RW, fixado a um bastão de vidro que promovia a agitação do sistema a 611 rpm a uma temperatura constante (figura 12).

Figura 12 - Síntese em agitador IKARW20



Fonte: este trabalho

Sabe-se que, se a solução não é devidamente agitada ocorre maior agregação, influenciando no seu tamanho e precipitação, o que está associado à estabilidade química da solução. Desta forma, um segundo teste foi realizado retornando ao equipamento anterior, porém mantendo o frasco da reação fechado e despejando a solução de citrato de sódio com uma seringa sem a abertura total do frasco, para garantir um sistema fechado e evitar instabilidade da reação. Desta forma, a síntese ocorreu nas mesmas condições de temperatura e agitação com tempo total de 15 minutos. As amostras de ambas as técnicas foram coletadas e avaliadas por DLS e potencial zeta.

4.1.2. Síntese de NPAs via redução por aminoácidos

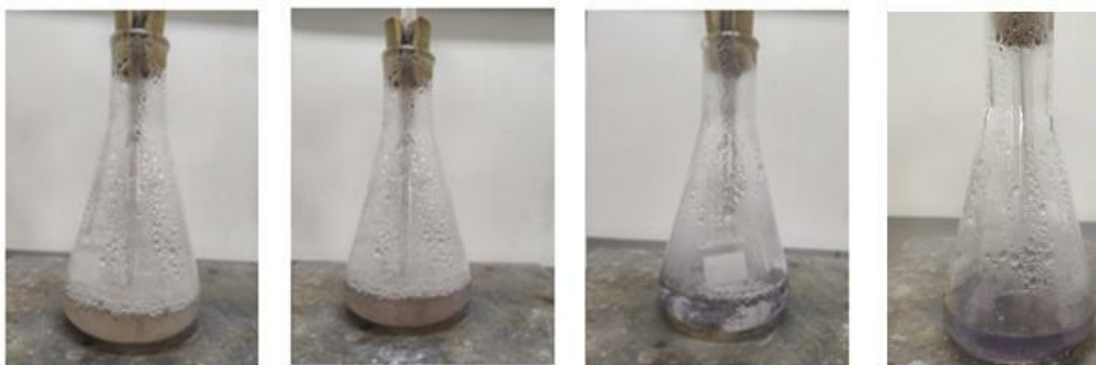
Foram realizados experimentos de síntese utilizando o aminoácido arginina (Sigma Aldrich, lote SLBR5483V) conforme metodologia adotada por ZARABI et al. (2015) com modificações, uma vez que o artigo referia o estudo

de outros aminoácidos e não do aminoácido arginina. Também foi realizada a síntese utilizando o aminoácido triptofano a 25 mM (Sigma Aldrich) nas mesmas condições experimentais utilizadas para arginina. Importante ressaltar que o artigo em questão não fornecia as informações sobre temperatura e agitação utilizadas nas sínteses para reprodução do ensaio. Contudo, assim como na reação por Turkevich foi verificado ao longo dos experimentos a influência da agitação no tamanho e estabilidade das NPs.

Primeiramente foi realizada a síntese de nanopartículas de ouro utilizando concentrações variadas de arginina. Foram determinadas três concentrações: 25 mM, 35 mM e 45 mM estabelecendo o volume final da solução em 25 mL. As soluções de aminoácidos nas molaridades supracitadas foram aquecidas separadamente até a ebulição (98°C) com 24,5 mL de água MILI-Q corrigindo o volume final. Depois de atingida a temperatura foi adicionado 5,0 mL de cloreto de ouro III triidratado a 5 mM (Sigma Aldrich Lote: MKCJ4933), mantendo-se as mesmas condições de temperatura e agitação (velocidade: 25 rpm). Logo após foram adicionados 0,5 mL de solução contendo 0,05 mmoles de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1 M, seguido de bloqueio da reação em banho de gelo. A formação das NPs ocorreu após 3,5 minutos da adição de SDS à solução, permanecendo nas mesmas condições de temperatura e agitação até a obtenção da cor lilás a roxo-púrpura, o máximo de coloração observada até interromper a reação.

A conversão em partículas não ocorre de maneira imediata, ocorrendo após cerca de 4 minutos mantendo as mesmas condições de temperatura e agitação após a adição de cloreto de ouro III e SDS. Tal fato é percebido pela alteração da cor da solução e independente da concentração molar a cor avança do lilás ao roxo, conforme Figura 13, não iniciando da cor vermelho-rubi como ocorre no método de Turkevich et al. (1951).

Figura 13 - Síntese NP_{Au} pela redução com arginina.



Mudança da coloração da solução ao longo do tempo evidenciando a formação das nanopartículas de ouro. Da direita para a esquerda, imediata adição do cloreto de ouro e SDS; observação do início da mudança de cor após 3 minutos; minuto seguinte a mudança da cor em todas as concentrações.

Fonte: este trabalho

4.1.3 Determinação das Característica Físico-químicas das AuNPs

Foram coletadas amostras de 1 mL para análise do perfil de absorbância a 280 nm e verificação da conversão em equipamento Nanodrop UV-vis; a determinação do potencial zeta e análise do tamanho hidrodinâmico médio no equipamento Zetasizer Nano ZS90 de todas as nanopartículas sintetizadas. As leituras foram realizadas utilizando as cubetas DTS1061 para análise do tamanho e DTS0012 da marca Altmann, para análise do potencial zeta, seguindo a metodologia descrita pelo equipamento, com fator de diluição de 1:10 utilizando água MILI-Q conforme recomendação do fabricante.

4.2. ENSAIO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO VISANDO ATUAÇÃO EM CÉLULAS TUMORAIS

4.2.1 Produção das Proteínas Echistatina e GFP Recombinantes

A produção das proteínas recombinantes Echistatina e GFP (proteína verde fluorescente) foi realizada pelo grupo do Prof. Geraldo Magalhães

Santana, Instituto Butantan, colaborador deste projeto, segundo descrito por Siqueira et al. (2019). A Echistatina foi clonada em vetor PAE e cultivada em meio LB na presença de ampicilina, a extração da proteína foi obtida através da técnica de sonicação e o produto purificado em filtro membrana 0,22 μm .

As proteínas GFP e Echistatina foram purificadas, dialisadas em tampão PBS 0,5x e avaliadas quanto à pureza através da técnica de SDS-PAGE e concentrações totais determinadas pelo método BCA (Ácido Bicinconínico) respectivamente em, 700 μg e 330 μg com absorvância a 280 nm.

4.2.2. Funcionalização das AuNPs com Echistatina e GFP

Por ser considerado um método consolidado que produz em geral nanopartículas estáveis, as nanopartículas sintetizadas na presença de citrato de sódio foram escolhidas para estudo prévio de interação com proteínas.

Após ensaios de caracterização físico-química através da determinação do potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico, as nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio foram utilizadas na preparação de complexos com as proteínas GFP e Echistatina para posterior ensaio de transfecção e citotoxicidade em células He-la e U-87.

A preparação da formulação das nanopartículas com as duas proteínas foi efetuada em tubos Eppendorfs considerando a concentração das proteínas em questão e assumindo 100% de conversão das NPs na reação (92 ng/ μL). O procedimento foi realizado em gelo e após a adição das soluções a mistura permaneceu em contato por pelo menos 30 minutos antes dos próximos ensaios.

A Tabela 1 apresenta a proporção mássica das soluções utilizadas na preparação do complexo para os próximos testes.

Tabela 1 – Proporção mássica entre as soluções utilizadas na formulação para o teste de fluorescência e ensaio de viabilidade celular.

Amostra	Tampão PBS 0,5x (μL)	NPAU (μL)	GFP* (μL)	Echistatina** (μL)
C1	68	2,0
C2	45	20	5,0	...

1	43	20	5,0	2,0
2	41	20	5,0	4,0
3	37	20	5,0	8,0
4	30	20	5,0	15

* $C_{GFP} = 1,0 \text{ mg/mL}$; $C_{ECH} = 0,330 \text{ mg/mL}$.

4.2.3. Cultivo e Transfecção de Células HeLa e U-87MG

As células selecionadas para estudo foram a U-87 linhagem primária de glioblastoma com alta expressão de integrina e He-la (Human epitheloid carcinoma) oriunda de tumor cervical pouco permissiva à Echistatina.

As células HeLa e U-87MG foram cultivadas em meio Dulbecco (DMEM, Embriolife) com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, Inglaterra). As células cresceram em frascos de 75cm^2 na presença de antibiótico penicilina-streptomicina (Gibco, Inglaterra) e incubadas em ambiente umidificado contendo 5% de CO_2 e temperatura de 37°C .

Após atingirem confluência, as células foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 poços contendo (5×10^5 células por poço) e 96 poços contendo (5×10^4 células por poço) e incubadas por 48 horas até atingir nível de confluência entre 70-80% e então transfectadas com as diferentes soluções contendo os complexos de nanopartículas GFP e Echistatina, conforme tabela acima (Tabela 1). Antes do ensaio de citotoxicidade foi realizado um ensaio prévio em placa de 24 poços com 20ul da formulação para verificar adsorção do complexo NPAU-GFP em células sob microscópio de fluorescência Evos™ modelo AMG. Os ensaios de transfecção e viabilidade celular foram realizados pela pós-doutoranda Marianna Favaro, do Instituto de Ciências Biomédicas do ICB II, colaboradora do projeto, tendo minha participação a título de treinamento.

4.2.4. Estudo de Citotoxicidade

Para determinação da eficiência de direcionamento e citotoxicidade da proteína Echistatin na formulação, quando associada à NPAus, foi realizado o ensaio WST, utilizando o reagente tetrazólio solúvel em água útil como

marcador de atividade enzimática das mitocôndrias. O ensaio foi feito segundo as instruções do fabricante. Em resumo, em placas de 96 poços foram adicionados 4 µl da formulação adsorvida em várias concentrações com 10 µl de WST. O controle positivo utilizado foi o Triton 0,1% e o meio DMEM utilizado como o “branco” da reação. A leitura da placa foi obtida através do equipamento Epoch, Biotek™ e visualizada através do microscópio de transmissão Evos™ modelo AMG.

A Figura 14 mostra o esquema ilustrativo da placa de 96 poços utilizada no experimento em dois tempos distintos de análise, 4h e 24h. Para cada célula foi utilizada uma placa.

Figura 14 – Esquema do ensaio em placa de cultura celular de 96 poços.

A	célula	célula	célula	célula	célula		célula	célula	célula	célula	célula	
B	C1	C1	C1	C1	C1		C1	C1	C1	C1	C1	
C	C2	C2	C2	C2	C2		C2	C2	C2	C2	C2	
D	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	
E	2	2	2	2	2		2	2	2	2	2	
F	3	3	3	3	3		3	3	3	3	3	
G	4	4	4	4	4		4	4	4	4	4	
H	C+	C+	C+	meio	meio	meio	C+	C+	C+	meio	meio	meio
			Tempo: 4h						Tempo: 24h			

Na primeira fileira (A) foi adicionada a respectiva célula para estudo, utilizada como controle negativo; Na fileira (B) foi adicionada ao poço a mistura C1; Na fileira (C), a mistura adsorvida C2; nas fileiras (D), (E), (F) e (G) foi adicionado ao poço respectivamente as misturas dos tubos 1, 2, 3 e 4; Nos três primeiros poços da fileira (H) foi adicionado o controle positivo do teste e o meio utilizado como “branco”

4.3. ENSAIO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO VISANDO INDUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS

4.3.1. Determinação da Capacidade de Adsorção de Proteínas em AuNPs

A análise permite definir a concentração da proteína adsorvida nas nanopartículas em solução. O estudo foi realizado utilizando a proteína GFP e o domínio RBD do vírus SARS-COV 2.

A partir da lei de Lambert - Beer é possível relacionar a absorbância e as propriedades da solução, por meio da equação:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

Em que A representa absorbância, ε representa a absorvidade molar da proteína GFP, b é o caminho óptico, e C a concentração da substância. Neste experimento $b = 1 \text{ cm}$ e $\varepsilon = 21,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 21900 \frac{1}{\text{M.cm}}$.

Pelo modelo de Langmuir é possível verificar a capacidade máxima de adsorção do material em solução. Sua equação modelo é largamente utilizada na representação do processo de adsorção, que se baseiam nos seguintes pressupostos: existência de um número definido de sítios; sítios os quais têm energia equivalente e as moléculas adsorvidas não interagem entre si; a adsorção ocorre em uma monocamada e quando cada sítio pode comportar apenas uma molécula adsorvida (NASCIMENTO, 2014)

A teoria de Langmuir assume que a adsorção ocorre em sítios específicos e homogêneos na superfície do adsorvente e cada sítio é responsável pela adsorção de apenas uma molécula, não podendo ocorrer nenhuma adsorção adicional. A equação a seguir descreve a teoria de Langmuir (DOTTO, 2011).

$$Q^* = \frac{Q_m \cdot C^*}{K_d + C^*}$$

A solução de nanopartículas com potencial zeta -40 mV e tamanho 43 nm seguiram para estudo de adsorção de proteínas.

4.3.1.1. Estudo de adsorção de GFP em Nanopartículas de Ouro

Para determinar o quanto as nanopartículas de ouro conseguem adsorver proteínas GFP em solução, foram estabelecidas sete condições contendo a proteína GFP 0,5x em diferentes proporções volumétricas, incubadas por 50 minutos em temperatura ambiente, centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm a 25°C e analisadas por espectrofotometria uv-vis a 280 nm em equipamento Nanodrop - DS-11 FX+ Spectrophotometer.

A amostra C0 foi utilizada como “branco” para construção da curva de calibração (Tabela 2).

Tabela 2 - Proporção mássica entre as soluções utilizadas na formulação para o ensaio de adsorção de GFP.

Amostra	PBS 0,5X (µl)	NPAu (µl)	GFP (µl)
C0	20	20	0
C1	18	20	2
C2	16	20	4
C3	12	20	8
C4	10	20	10
C5	6	20	14
C6	4	20	16
C7	2	20	18

* C_{GFP} = 1,0 mg/mL

4.3.1.2. Estudo de adsorção do domínio RBD em Nanopartículas de Ouro

Para avaliar quanto de RBD adsorve em cada microlitro de suspensão de nanopartículas de ouro foram estabelecidas sete condições contendo a proteína em diferentes proporções volumétricas, incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente, centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm a 25°C e analisadas por espectrofotometria uv-vis a 280 nm em equipamento Nanodrop - DS-11 FX+ Spectrophotometer. A amostra C0 foi utilizada como “branco” para construção da curva de calibração (Tabela 3).

Tabela 3 - Proporção mássica entre as soluções utilizadas na formulação para o ensaio de adsorção de RBD.

Amostra	PBS 0,5x (μ l)	NPAU (μ l)	RBD (μ l)
C0	28	22	0
C1	26	22	2
C2	24	22	4
C3	20	22	8
C4	16	22	12
C5	12	22	16
C6	10	22	18
C7	6	22	22

*CRBD= 621 ng/ μ L

4.3.1.3. Ensaio de Fluorescência da GFP após Adsorção em AuNPs

A fluorimetria consiste na determinação qualitativa e quantitativa de uma substância que manifesta o fenômeno de fluorescência, como resultado da absorção de energia radiante e emissão de uma parcela desta energia. Diferente do fenômeno de fosforescência, na fluorescência o intervalo de tempo entre a captação do fóton e a emissão da energia captada é extremamente curto ($<10^{-5}$ s, podendo ser de até 10-12 s), portanto, a energia é emitida mais rapidamente devido aos orbitais eletrônicos emparelhados e os spins dos elétrons em direções opostas (estado excitado singlete), a molécula sofre uma transição do estado excitado singlete para o estado fundamental singlete, libera energia e emite a fluorescência (SANTOS; GIL, 2010).

O ensaio de fluorescência foi realizado com o objetivo de avaliar se a adsorção da proteína GFP à nanopartícula de ouro afetaria a emissão da fluorescência. Para esse ensaio, foram estabelecidas sete condições variando a concentração de proteína GFP (0 a 18 μ g/mL) assumindo concentração única de nanopartículas de ouro em 20 μ L para um volume final de 70 μ L em PBS 0,5x. A leitura ocorreu em feixe de excitação em comprimento de onda 485

nm e emissão em 535 nm em equipamento Fluorat-02, Lumex Instruments.

4.3.1.4. Funcionalização das Nanopartículas de ouro às proteínas C-terminal e N-terminal visando ensaio de ELISA

Foram estabelecidas duas formulações utilizando a proteína #5 N-terminal nucleocapsídeo, uma dessas amostras foi apenas centrifugada, com seu sobrenadante coletado para o teste e rotulada como (5C) e outra, centrifugada e ressuspensa em 100 uL de tampão Tris-Glicina, rotulada como (5R). Assim como, foram formuladas duas amostras para a proteína #6 C-terminal nucleocapsídeo, uma dessas amostras apenas centrifugada, com seu sobrenadante coletado e utilizado para o teste (6C) e outra, centrifugada e ressuspensa em 100 ul de tampão Tris-Glicina (6R). O ensaio foi realizado em duplicata. As amostras e suas proporções volumétricas estão registradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Proporção volumétrica entre as soluções utilizadas na formulação para o ensaio sorológico de ELISA.

Amostra	Tris-Glicina (uL)	NPAu (uL)	Proteína #5 N-TERMINAL (uL)
#5C	66	10	24
#5R	66	10	24
#5R tubo 1 (controle)	90	10	-
#6C	53	10	37
#6R	53	10	37
#6R tubo 2 (controle)	90	10	-

4.3.1.5 . Ensaio de Enzyme-linked Imunosorbent assay (ELISA)

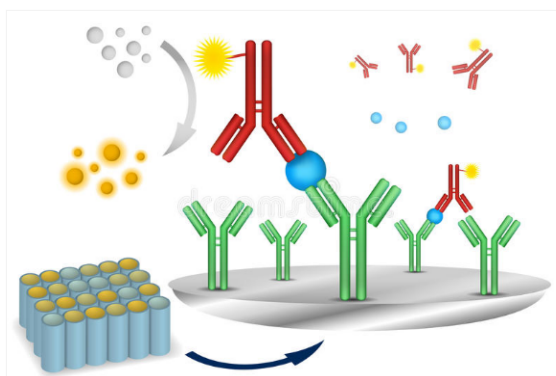
O antígeno da reação consiste em um fragmento do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 (proteína N) incorporado ou não a diferentes formulações de nanopartículas de ouro, conforme tabela descrita anteriormente (Tabela 4).

As amostras de soro utilizadas no teste são oriundas de indivíduos convalescentes de COVID-19. O ensaio ocorreu em microplaca de 96 poços de poliestireno de alta ligação (Corning, EUA) revestidas com 200 ng de proteína por poço (diluído em 100 L PBS) incubadas por 1 hora a 37°C seguida de bloqueio overnight a 4°C com 5% leite desnatado e 1% BSA em 0.05% PBS-T (Tween 20/PBS).

As microplacas foram previamente lavadas 3x em PBS-T e as amostras de soro adicionadas aos poços diluídas 1:100 e incubadas durante 1 h a 37°C. Após incubação, o conjugado diluído de cabra anti-IgG humano peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA - cód A0170> diluído 1:4000) foi adicionado aos poços, as placas foram incubadas novamente por 1 h a 37°C, lavadas e devolvidas em tampão citrato (pH 5,8) contendo 0,4 mg/mL de dicloridrato de ortofenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) e 0,12% H₂O₂. A reação foi interrompida após 15 minutos com a adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 2 N.

A densidade óptica da reação foi medida a 492 nm em leitor de placas EPOCH (Labsystems Multiskan, Thermo Scientific, EUA). A Figura 15 ilustra, de forma genérica, uma reação do tipo ELISA.

Figura 15 - Ilustração da reação antígeno anticorpo no teste em microplaca.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Com o objetivo de obter nanopartículas estáveis na faixa de tamanho e potencial zeta aceitáveis, de acordo com a literatura, foram realizados experimentos de síntese utilizando-se o aminoácido Arginina, conforme metodologia adotada por ZARABI et al (2015) com modificações. Primeiramente, foram realizadas sínteses de nanopartículas variando a concentração molar do aminoácido. Foram estabelecidas três diferentes concentrações (25 mM, 35 mM e 45 mM) e as condições utilizadas foram aquelas já descritas anteriormente. Os resultados estão listados na Tabela 2.

Posteriormente, a síntese das nanopartículas foi realizada variando-se a concentração de SDS em solução, com o objetivo de verificar o impacto da variação na concentração do SDS na estabilidade das partículas sintetizadas. Foram estabelecidas três concentrações de SDS: 0,01 mmol/L, 0,05 mmol/L e 0,03 mmol/L utilizando as mesmas condições de temperatura e agitação. Os resultados estão listados na Tabela 3.

O aminoácido triptofano também foi utilizado na síntese de nanopartículas de ouro, conforme protocolo descrito por ZARABI et al (2015). Além disso, por ser considerado um método consolidado que produz em geral nanopartículas estáveis, paralela a síntese de nanopartículas de ouro reduzidas com arginina, também foi realizada a síntese e estudos de caracterização físico-química de nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio.

Uma vez que a síntese de NPs com adição de citrato de sódio já estava mais consolidada e o tamanho e morfologia obtidos, de acordo com a literatura, apresentava potencial, a amostra seguiu para os ensaios em células visando estudo com echistatina e SARS COV-2.

O tamanho da NP, de acordo com alguns estudos, parece ser um ponto crucial no direcionamento. Pan et al (2007) demonstraram que a citotoxicidade das nanopartículas de ouro depende predominantemente de seu tamanho e

não necessariamente da estrutura química da molécula alvo. Neste estudo avaliando a NP complexada observaram que AuNPs de 1-2 nm eram altamente tóxicas quando comparadas às NPs complexadas >15 nm demonstrando serem razoavelmente não tóxicas (PAN et al., 2007).

Harper et al, (2011) descobriram que o comportamento das NPaus é modulado pelo tamanho do núcleo, sendo que nanopartículas carregadas positivamente são possivelmente mais tóxicas que as NPs carregadas negativamente, bem como, possivelmente são mais tóxicas as nanopartículas menores quando comparadas às maiores. RAZAK et al, (2017) refere estudos que indicam que as AuNPs de morfologia esférica e tamanho médio de 50 nm são absorvidas mais rapidamente e de maneira mais eficiente pelas células em comparação com AuNPs menores de 10 nm e maiores que 100 nm (RAZAK et al 2017).

5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

5.2.1. Parâmetros físico-químicos das AuNPs reduzidas por aminoácidos

As análises de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) fornecem o diâmetro hidrodinâmico médio das AuNPs sintetizadas, bem como, os valores de polidispersidade de tamanhos, índice que varia de 0 a 1. Para estudo do DLS foi utilizado o equipamento ZetaSizer Nano ZS90, Malvern™.

A Tabela 5 apresenta os resultados de diâmetro hidrodinâmico médio e desvio-padrão, obtidos por meio do equipamento ZetaSizer, para as três concentrações molares de aminoácidos utilizadas.

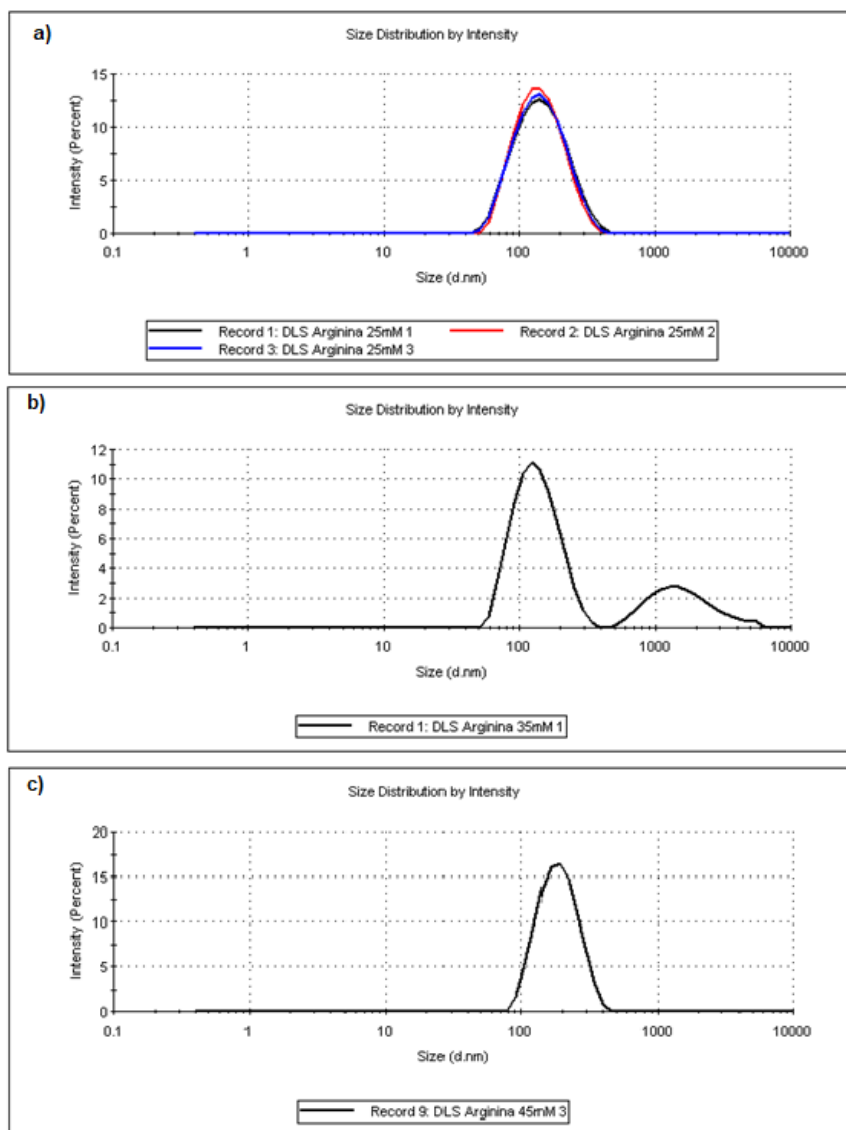
Tabela 5 – Diâmetro hidrodinâmico médio polidispersidade de nanopartículas de ouro sintetizadas via redução com aminoácidos variando-se a concentração de **arginina**.

Concentração Molar (mM)	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
25	126,6+-67,6	0,18
35	139,0+-52,4	0,37
45	174,7+-63,1	0,08

Fonte: este trabalho

Os resultados indicam que as menores nanopartículas foram obtidas com concentrações mais baixas de aminoácidos. Sabe-se que valores do índice de polidispersidade (PDI) variam de 0, para uma amostra idealmente monodispersa, a 1, para uma amostra com uma larga distribuição de tamanho (FAYAD, 2009). A Figura 16 apresenta as curvas de distribuição de tamanho obtidas no DLS para as três concentrações, respectivamente 25 mM, 35 mM e 45 mM. As NPs sintetizadas com arginina a 35 mM apresentaram duas populações com tamanhos distintos na faixa de 139 nm e 1769 nm, com maior polidispersão (PDI) em relação às demais concentrações utilizadas.

Figura 16- Distribuição de tamanho por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) de nanopartículas de ouro sintetizadas com diferentes concentrações molares de arginina.



Uma vez que a utilização da concentração de 25 mM de arginina apresentou nanopartículas menores e valores de PDI satisfatórios, foi realizada a síntese utilizando arginina a 25 mM mas, variando-se a concentração do agente estabilizante SDS (dodecil sulfato de sódio).

A Tabela 6 apresenta os resultados para as três concentrações de SDS utilizadas.

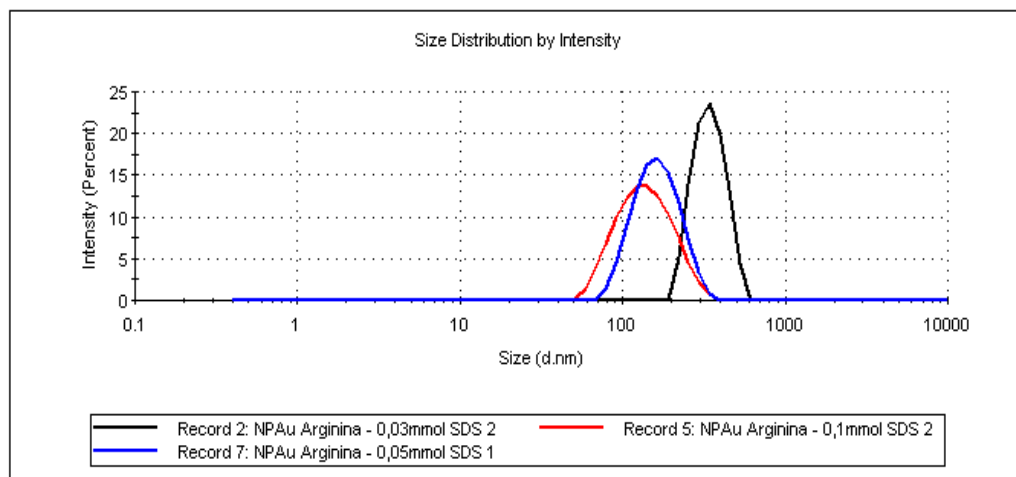
Tabela 6 – Diâmetro hidrodinâmico médio polidispersidade de nanopartículas de ouro sintetizadas via redução com aminoácidos variando a concentração do agente estabilizante SDS.

Concentração Molar (mmol/L)	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
0,03	359,1	0,217
0,05	152,8	0,075
0,1	121,6	0,196

É possível notar que as menores partículas foram obtidas com concentrações maiores de SDS, uma vez que baixas concentrações de SDS parecem influenciar no tamanho e, por conseguinte, agregação ou fusão das partículas. Sabe-se que o SDS é um surfactante aniônico que age como agente estabilizante na reação conferindo repulsão eletrostática e protegendo a NP impedindo que as demais partículas em solução se unam (KVITEC, 2008).

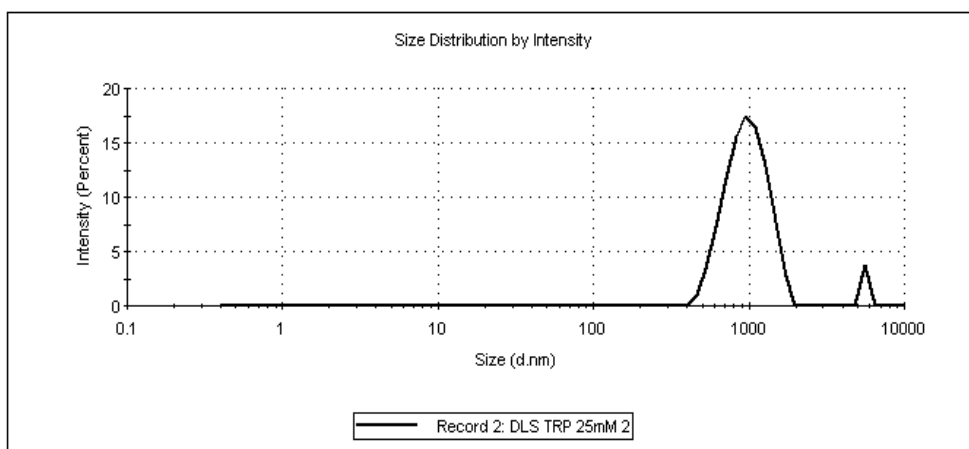
A Figura 17 apresenta a diferença de tamanho entre as NPAus produzidas com 0,03 mmol/L, 0,05 mmol/L e 0,1 mmol/L de SDS utilizando-se as mesmas condições de temperatura e agitação.

Figura 17 - Gráfico de Distribuição de Tamanho por Intensidade de espalhamento de luz. O tempo no qual a correlação do sinal começa a cair refere o diâmetro médio, o pico mais estreito reflete PDI menor em relação ao pico com linha de base maior.



As nanopartículas de ouro produzidas via redução com o aminoácido triptofano a 25mM apresentaram diâmetros hidrodinâmicos em torno de 992 nm, com desvio padrão estimado mensurado pelas análises do equipamento em 289 nm, não coerentes com os estudos de síntese realizados por ZARABI et al (2015), que obteve nanopartículas com tamanhos inferiores a 100 nm. A Figura 18 ilustra a distribuição de tamanho por DLS de nanopartículas sintetizadas com triptofano 25 mM, que apresentaram PDI de aproximadamente 0,5.

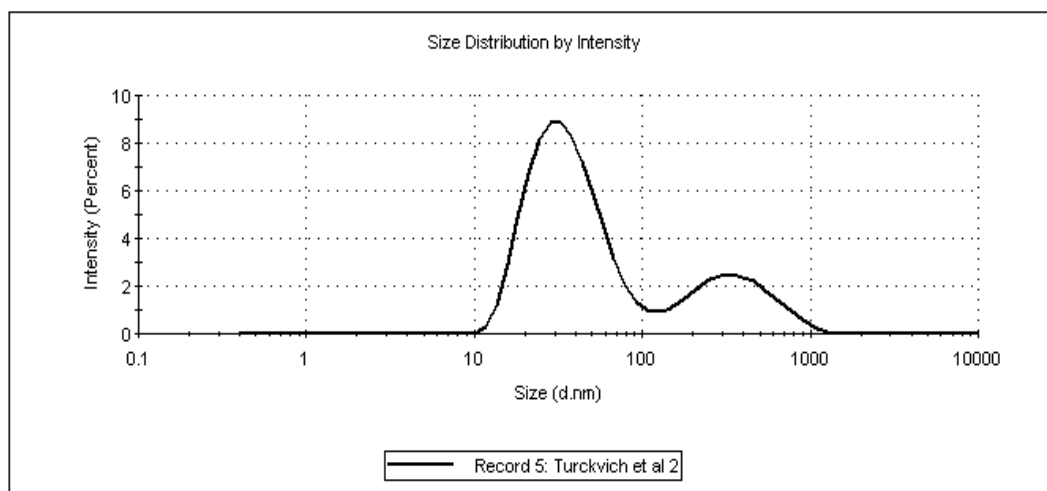
Figura 18 - Gráfico de Distribuição de Tamanho por Intensidade de espalhamento de luz de nanopartículas sintetizadas com Triptofano 25 mM.



Com o objetivo de aperfeiçoamento e comparação foram realizadas diversas sínteses de nanopartículas de ouro através do método de adição de citrato, baseado em Turkevich, para todos os ensaios. Após a síntese, as amostras seguiram para os testes de caracterização físico-química,

O gráfico da Figura 19 ilustra a distribuição de tamanho por DLS de nanopartículas reduzidas por citrato de sódio. É possível observar duas populações de tamanho, com polidispersidade intermediária de 0,4 e diâmetro médio de 35 nm, similar a diâmetros obtidos na maioria dos estudos utilizando este método (PALMA, 2017).

Figura 19 - Gráfico de Distribuição de Tamanho por Intensidade de espalhamento de luz de nanopartículas reduzidas por citrato de sódio



A análise do potencial zeta é o principal parâmetro para avaliar a estabilidade em dispersões coloidais. A Tabela 4 apresenta os valores determinados de potencial zeta para as três concentrações molares de arginina, com respectivos desvios-padrão mensurados pelo equipamento (11,8mV, 14,4mV, 12,2mV).

Tabela 7 - Potencial Zeta como medida de estabilidade de nanopartículas de ouro sintetizadas via redução com aminoácidos variando a concentração de arginina.

Concentração Molar (mmol/L)	Potencial Zeta (mV)
25	-22,5
35	-25,8
45	-25,4

A Tabela 8 apresenta os valores medidos de potencial zeta para as três condições de quantidades de SDS utilizadas no método de redução via aminoácidos.

Tabela 8 - Potencial Zeta como medida de estabilidade de nanopartículas de ouro sintetizadas via redução com aminoácido arginina, variando-se a concentração de SDS.

Concentração Molar (mmol/L)	Potencial Zeta (mV)
0,03	-13,0
0,05	-28,8
0,1	-48,4

Vale destacar que a solução coloidal preparada com baixa concentração de SDS (0,03 mmol/L), que resultou em menor valor de potencial zeta (-13,0 mV), apresentou, já no dia seguinte à síntese, a formação de particulado visível, indicando agregação.

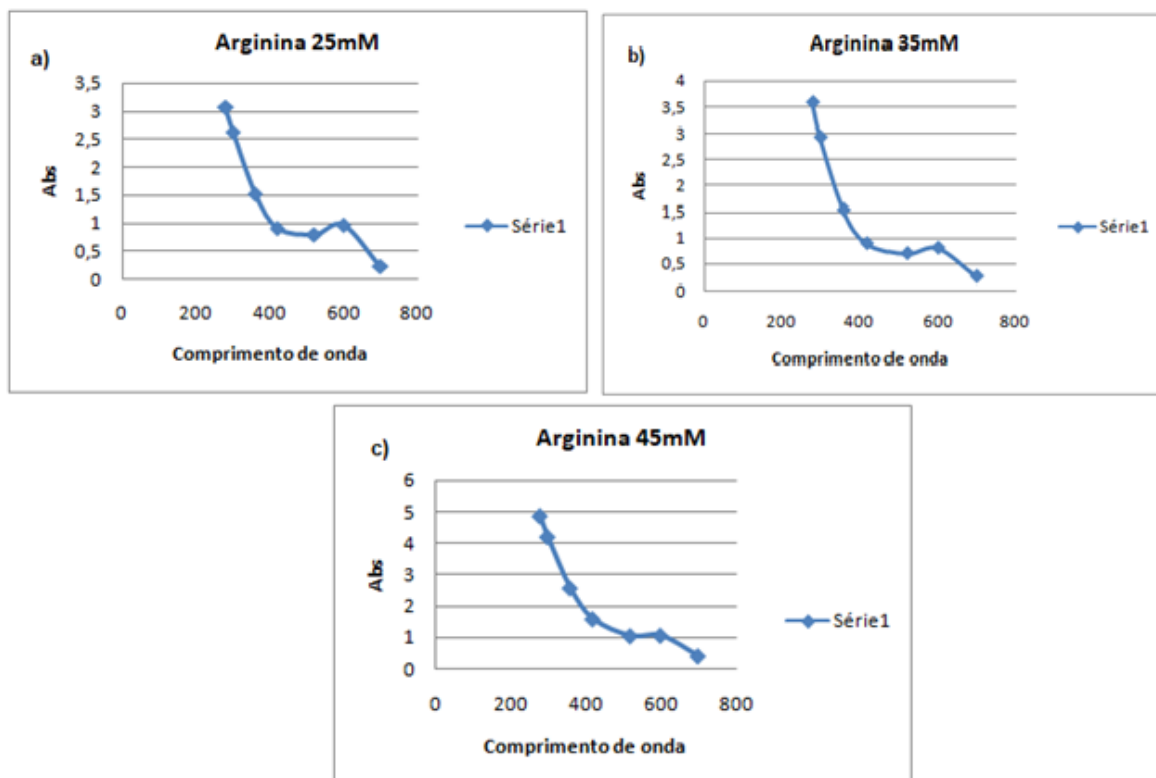
As nanopartículas de ouro reduzidas com triptofano 25 mM foram sintetizadas com 0,05 mmol/L de SDS, conforme indicado por ZARABI et al (2015) como melhor condição. Entretanto, apresentaram potencial zeta de -12,5 mV (desvio padrão de 10,7 mV), similar às AuNPs reduzidas com arginina em baixa concentração (0,03 mmol/L), o que reflete baixa estabilidade.

As propriedades ópticas da solução coloidal de ouro reduzidas em diferentes concentrações de arginina foram também analisadas por espectrometria UV-Vis em um intervalo de comprimento de onda de 300 a 700 nm. O espectro UV-vis foi observado para NPs produzidas com diferentes concentrações de arginina (a: 25mM, b: 35mM, c: 45mM) como demonstra a Figura 18. É possível observar picos de absorção entre 550 e 600 nm, faixa

típica para nanopartículas de ouro aproximadamente esféricas.

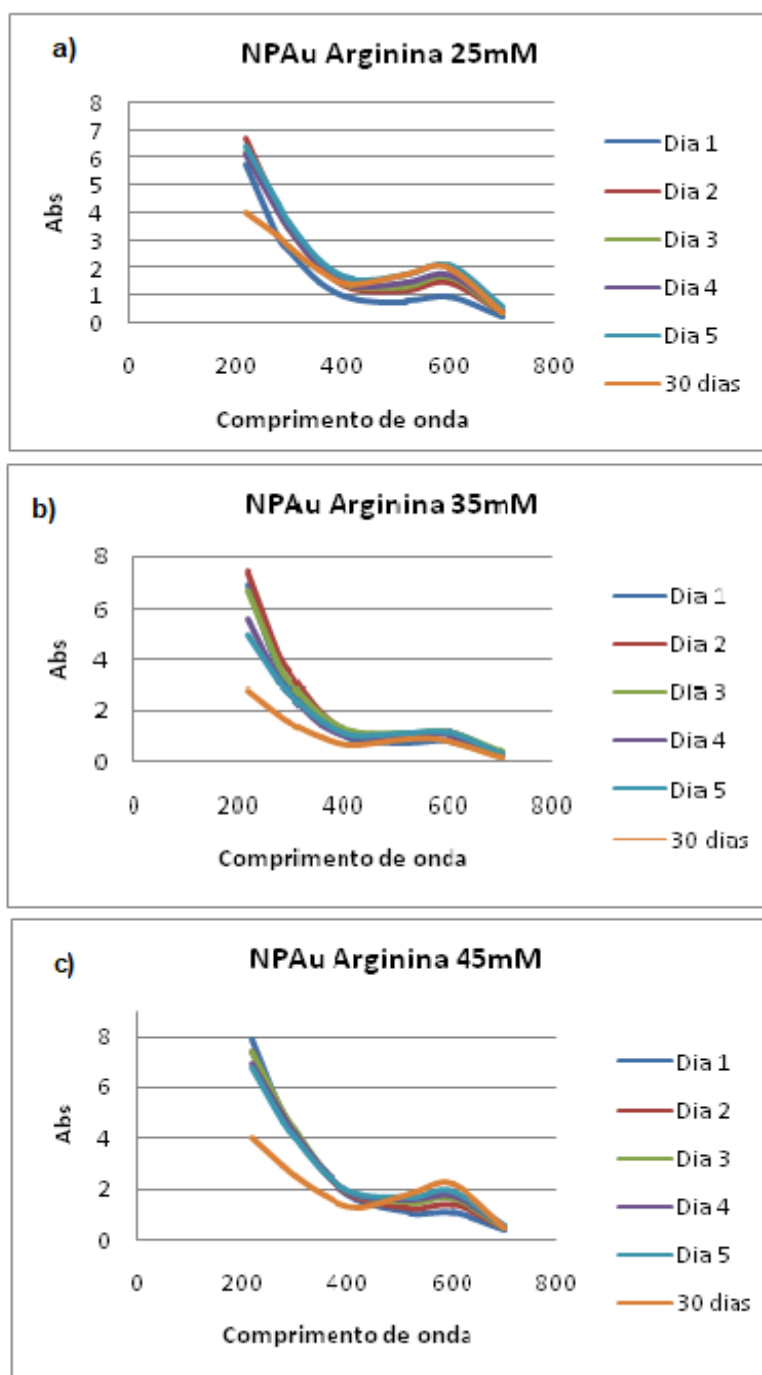
Nota-se espectro de absorção semelhante em todas as concentrações molares, o que parece coerente, uma vez que não há diferença de cor perceptível entre as soluções, tendo todas apresentado coloração roxa.

Figura 20 - Análise por Espectrofotometria UV-vis de nanopartículas de ouro preparadas em diferentes concentrações molares de arginina (a: 25 mM, b: 35 mM, c: 45 mM).



A Figura 20 apresenta o espectro de absorção da solução coloidal reduzida por arginina nas concentrações supracitadas durante os cinco primeiros dias e 30 dias após a síntese, a fim de observar possíveis mudanças nas propriedades ópticas das soluções. É possível observar que o pico correspondente ao intervalo entre 550 e 600 nm aumenta proporcionalmente ao longo dos dias nas três condições, o que pode indicar agregação ou fusão gradual das nanopartículas sintetizadas.

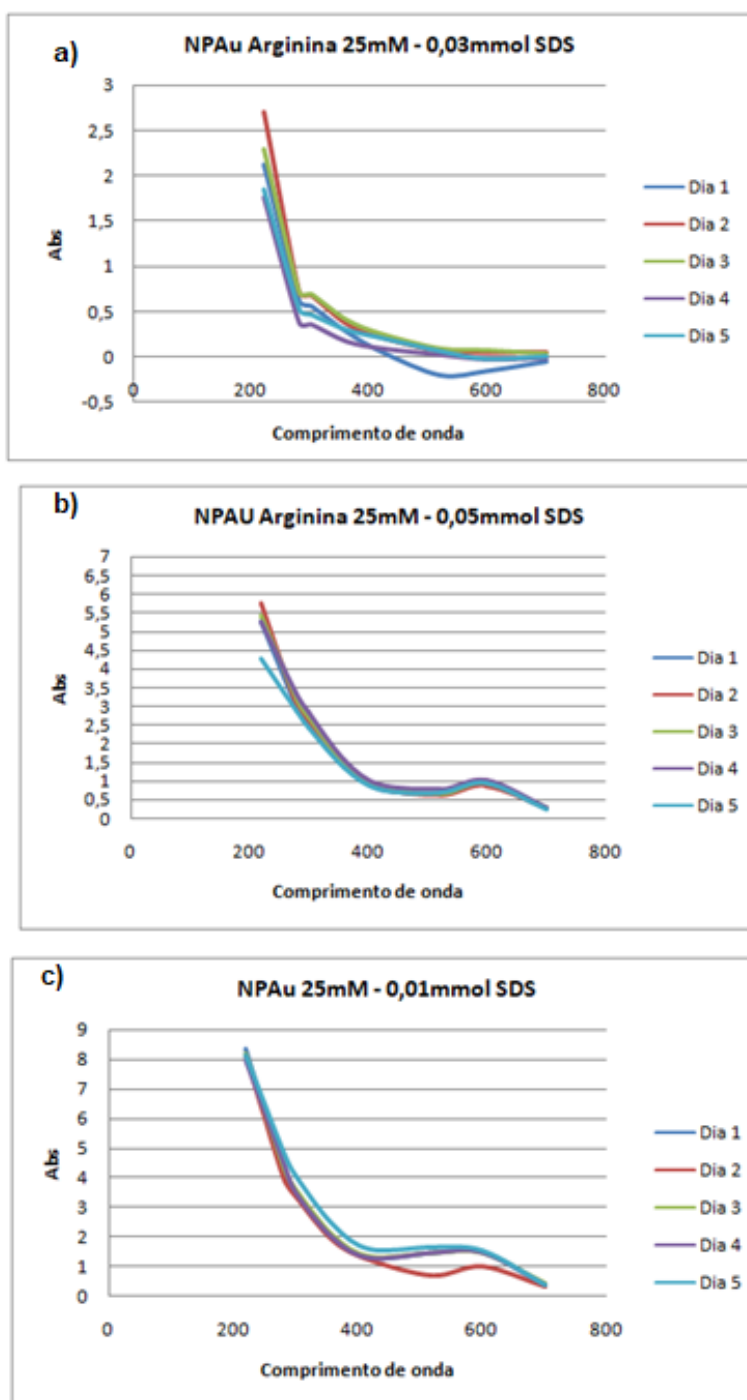
Figura 21 – Análise por Espectrofotometria UV-Vis de nanopartículas de ouro reduzidas com arginina nas três condições molares ao longo do tempo.



A análise por Espectrofotometria UV-Vis também foi realizada para nanopartículas sintetizadas em diferentes concentrações molares de SDS durante os cinco primeiros dias e no 30º dia após a síntese. É possível observar, na Figura 21, que a melhor condição de síntese utiliza concentrações

superiores a 0,03 mmol de SDS.

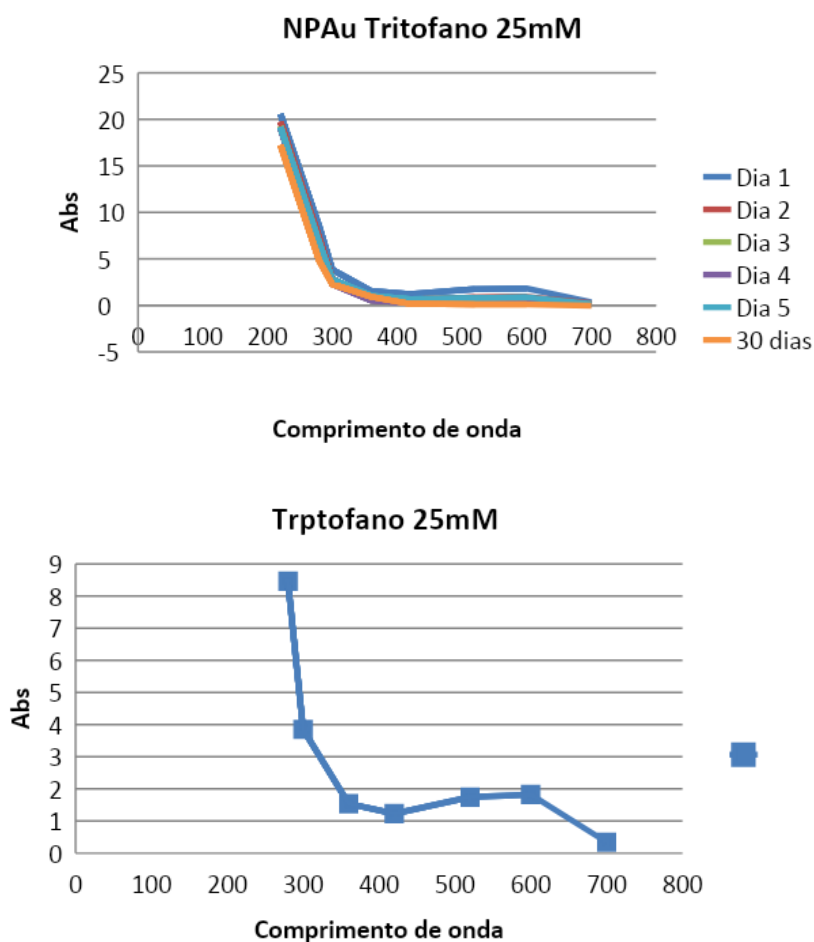
Figura 22 - Análise por Espectrofotometria UV-Vis de nanopartículas sintetizadas em diferentes concentrações molares de SDS. Em **(a)** 0,03 mmol; **(b)** 0,05 mmol; **(c)** 0,1 mmol de SDS.



O aminoácido triptofano também foi testado como agente redutor do cloreto de ouro na síntese de nanopartículas e dada a mudança de cor da

solução há a conversão em NPAs. A análise por espectrofotômetro imediata a síntese também evidenciou banda de absorção entre 550 e 600 nm. Entretanto, no dia seguinte após a síntese, o material encontrava-se precipitado e com partículas em suspensão, o que indicou agregação, corroborando com a ausência do pico, conforme Figura 23

Figura 23 – Análise por Espectrofotometria UV-vis de nanopartículas sintetizadas com Triptofano

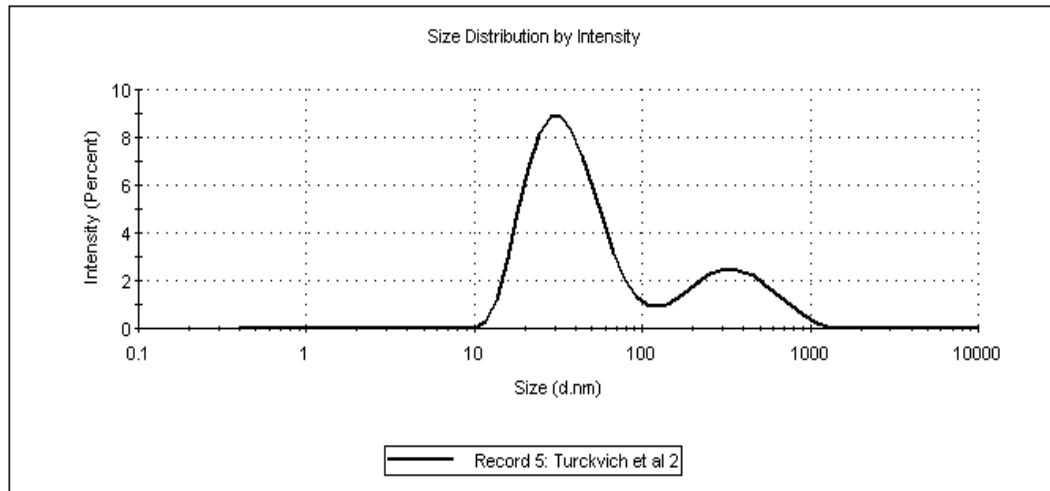


5.2.2. Parâmetros físico-químicos das nanopartículas reduzidas por meio de citrato de sódio

O gráfico da Figura 22 ilustra a distribuição de tamanho por DLS de nanopartículas reduzidas por citrato de sódio. É possível observar duas populações de tamanho, com índice de polidispersidade de 0,4 e diâmetro médio de 35 nm, similar a diâmetros obtidos na maioria dos estudos utilizando

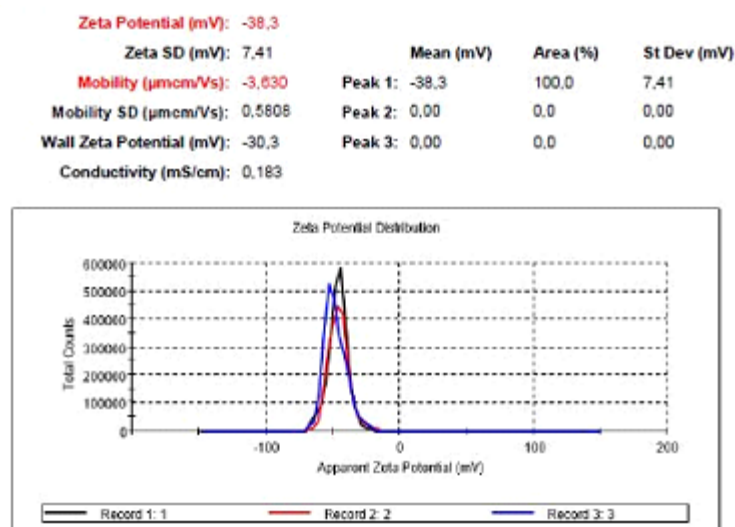
este método.

Figura 24 - Gráfico de Distribuição de Tamanho por Intensidade de espalhamento de luz de nanopartículas reduzidas por citrato de sódio.



A determinação do potencial zeta das nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio ocorreu nas mesmas condições das demais nanopartículas estudadas. A Figura 25 mostra o valor de potencial zeta de -38,3 mV, com sinal negativo, como esperado em nanopartículas obtidas por esse método, com desvio padrão estimado em 7,41 mV.

Figura 25 – Resultado da determinação do potencial zeta de nanopartículas de ouro sintetizadas via redução com citrato de sódio.

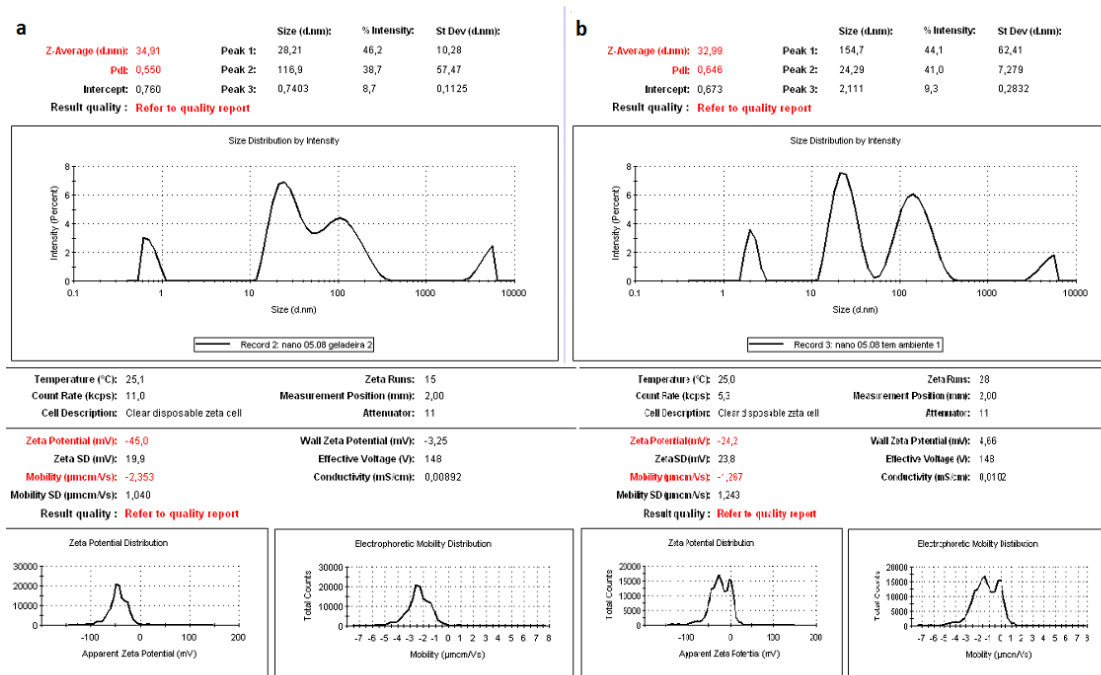


A Figura 26 apresenta os tamanhos, potenciais zeta e polidispersidades da mesma solução de nanopartículas de ouro sintetizada em sistema fechado, mas que foram armazenadas de maneiras distintas - refrigeradas, em temperatura entre 2 a 8°C, e em temperatura ambiente sob a bancada (no escuro). As amostras foram coletadas e armazenadas em tubo "falcon" de 15 mL e analisadas sob a proporção 1:20 em água ultrapura. O tempo de armazenamento foi de 30 dias e o teste foi realizado em duplicata.

A análise indica que as nanopartículas de ouro armazenadas em temperatura-ambiente apresentaram potencial zeta menor, (-24 mv) e polidispersidade maior (PDI = 0,6) indicando uma variedade maior de partículas de tamanhos diferentes, sugerindo maior agregação, mesmo não tendo sofrido alteração de seu tamanho. Ao passo que, nanopartículas mantidas refrigeradas mantiveram seu potencial zeta estável e índice de polidispersidade menor.

De acordo com a literatura, quanto maior o valor do potencial zeta (em módulo), é mais provável que o colóide seja estável, uma vez que partículas carregadas e com cargas iguais repelem umas às outras e essa força supera as forças de van der Waals, as quais promovem o fenômeno da agregação. Logo, potencial zeta mais elevado implica em dispersão mais estável; valores baixos podem indicar instabilidade coloidal e levar à agregação (MALVERN, 2012).

Figura 26 - Análise de Espalhamento Dinâmico de Luz ou Dynamic Light Scattering (DLS) e determinação do potencial zeta de nanopartículas sintetizadas com adição de citrato em sistema fechado.



Em a) observa-se nanopartículas de ouro mantidas refrigeradas; em b) nanopartículas de ouro mantidas em temperatura ambiente

5.3. ANÁLISE DE ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS POR NANOPARTÍCULAS REDUZIDAS POR CITRATO DE SÓDIO

5.3.1. Estudo da Capacidade de Adsorção da Proteína Modelo GFP em Nanopartículas de Ouro

Tendo em vista os objetivos deste trabalho, buscou-se avaliar se as AuNPs sintetizadas por meio de redução por citrato de sódio seriam capazes de adsorver proteínas. Primeiramente e tendo em vista a facilidade de detecção e quantificação analítica, avaliou-se a adsorção da proteína verde fluorescente GFP nas AuNPs, buscando-se levantar os parâmetros de adsorção Q_m e K_d propostos por Langmuir. Este estudo foi realizado em conjunto com a aluna de iniciação científica Luiza Lima. Desta forma, foi possível calcular a massa de GFP adsorvida após a reação, de acordo com a variação da concentração inicial de GFP em solução. Desta forma, foi possível,

a partir da diferença entre a quantidade inicial dispersa em solução de GFP e a quantidade após a adsorção, definir a capacidade de adsorção da nanopartícula Q_m , ou seja, qual massa de adsorbato é capaz de ser adsorvida por determinada massa de ouro.

Figura 27 - Isoterma de adsorção de GFP em AuNPs após 50 min de reação (tempo suficiente para atingir o equilíbrio).

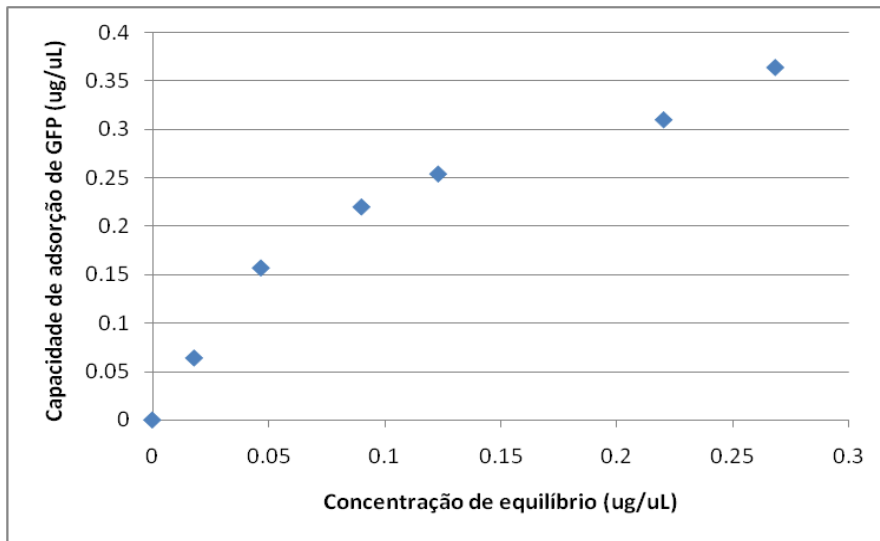
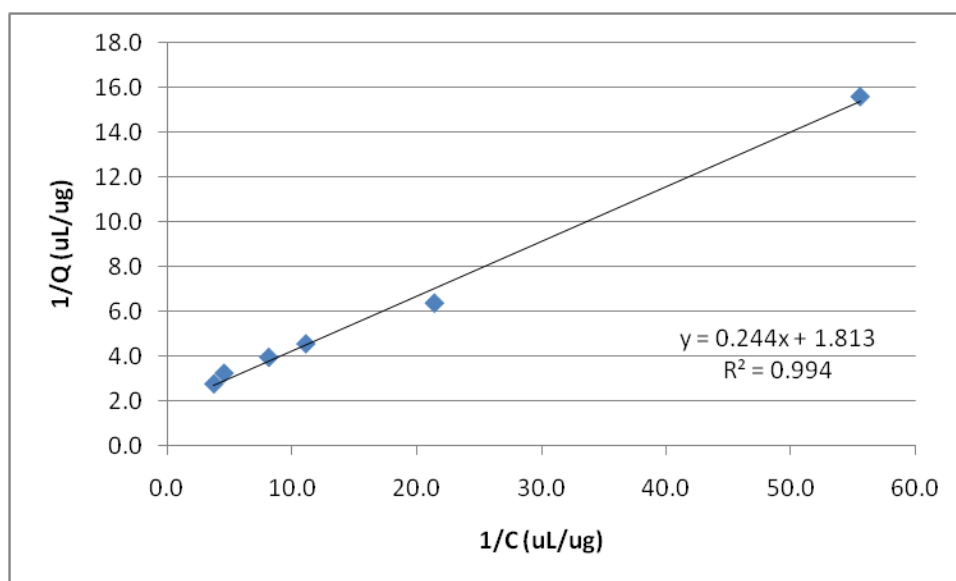


Figura 29 - Linearização da Isoterma de Langmuir, segundo Lineweaver-Burk, para a adsorção da proteína GFP, de forma a determinar-se os parâmetros Q_m e K_d da adsorção.



Pode-se assim, através de uma regressão linear simples usando-se a forma linearizada da equação de Langmuir, determinar-se a capacidade máxima de 0,55 ug GFP/uL de AuNP e Kd igual a 0,134 ug/uL. Isso indica uma interação não muito forte entre GFP e AuNPs, mas uma capacidade de adsorção considerável e suficiente para a continuidade dos estudos. Isso indica que 10 uL de solução de ouro poderão ser funcionalizados com 5,5 ug de proteína (GFP), o que é compatível, por exemplo, com estudos de vacinação de animais em estudos pré-clínicos.

5.3.2. Ensaio de Avaliação da Integridade da Proteína GFP por meio de Fluorimetria

Este ensaio teve por finalidade avaliar se a adsorção da proteína GFP na nanopartícula de ouro afeta a fluorescência da mesma, pois em teoria poderia eventualmente afetar a estrutura tridimensional, causando a desnaturação e inativando. A Figura 28 apresenta a emissão de fluorescência da solução de GFP isolada e de GFP complexada às nanopartículas de ouro.

Conforme os dados da tabela abaixo e análise do gráfico é possível observar que o sinal de fluorescência de GFP foi pouco afetado pela adsorção, ocorrendo ainda quando a proteína está ligada à nanopartícula e que, em condições crescentes de concentração a emissão não diminui de modo significativo.

Ainda que cada proteína pode ser afetada pela ligação à nanopartícula de ouro de modo diferente, não havendo portanto aqui qualquer generalização, este resultado nos permite supor que outras proteínas também poderão interagir com as AuNPs sintetizadas por redução por citrato de sódio sem que percam suas atividades biológicas, algo imprescindível no caso de aplicações farmacêuticas destas AuNPs funcionalizadas com proteínas.

Figura 28 - Quantificação da emissão de fluorescência da proteína GFP livre e adsorvida na superfície de nanopartículas de ouro.

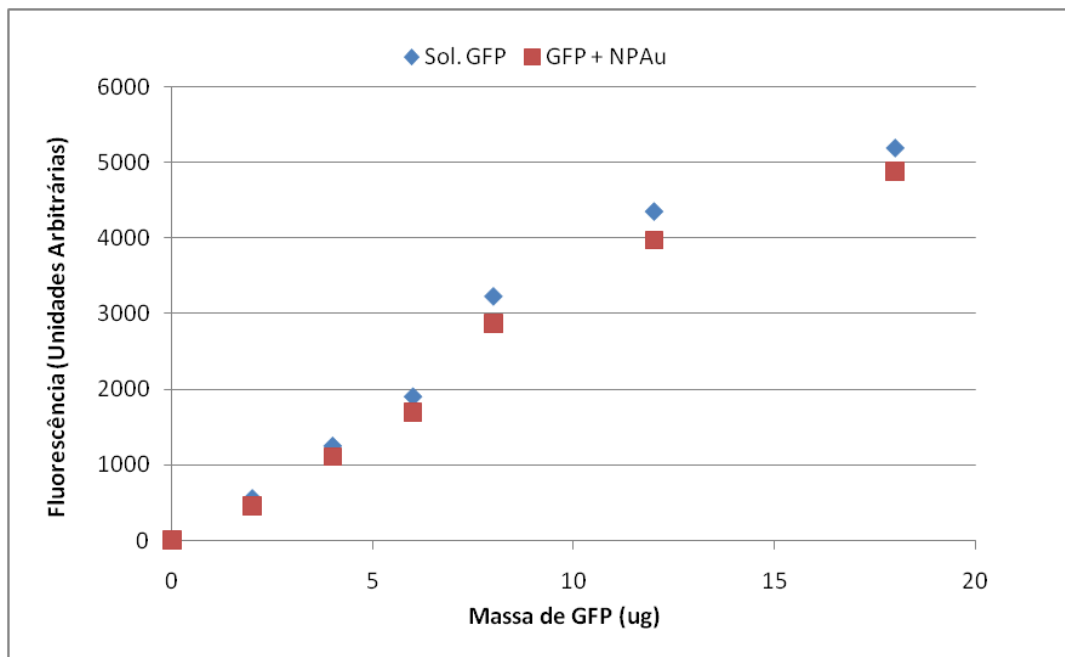


Tabela 9 - Quantificação da emissão de fluorescência da proteína GFP livre e adsorvida em AuNPs em diferentes concentrações por ensaio.

Massa GFP (ug) por ensaio	Fluorescência da GFP (UF)	Fluorescência da GFP+NPAu (UF)
0	0	0
2	554,8	452,5
4	1248,4	1107,8
6	1900,7	1691,2
8	3226,7	2873,1
12	4349,9	3973,6
18	5189,8	4885,4

5.3.3. Estudo de Capacidade de Adsorção da Proteína RBD (Covid-19) em Nanopartículas de Ouro

De forma semelhante à realizada para a adsorção de GFP, também foi avaliada a capacidade das nanopartículas de ouro adsorverem o domínio RBD de ligação do Coronavírus, comumente utilizado em vacinas contra esta

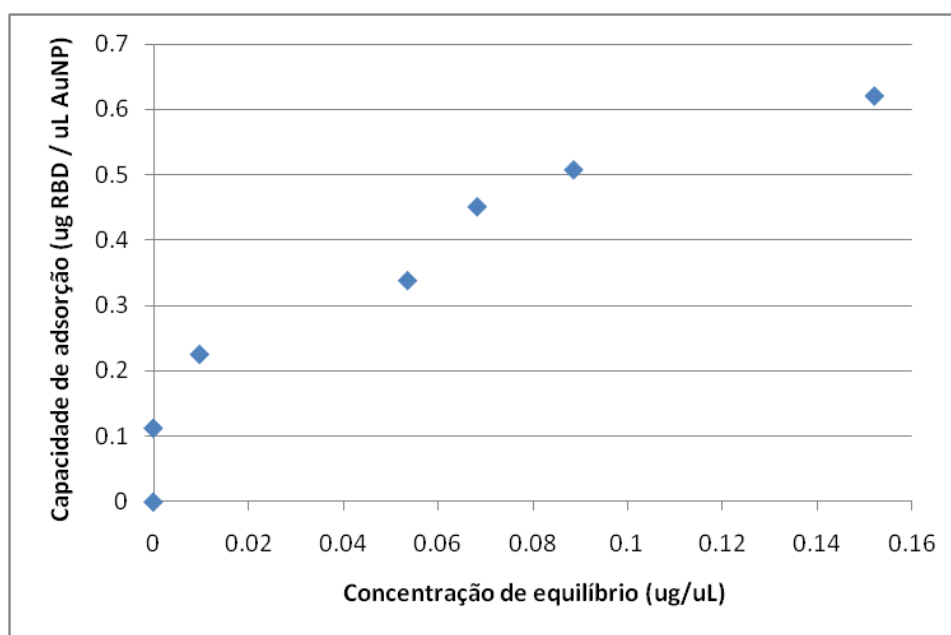
doença. A Tabela 10 mostra os valores encontrados nos ensaios de adsorção e a Figura 29 apresenta o gráfico de adsorção de onde podem ser estimados os valores de Q_m e K_d segundo o modelo de Langmuir. Pode-se estimar um valor de Q_m próximo a 0,65 ug/uL e um valor de K_d próximo de 0,045 ug/uL, indicando que a adsorção da proteína RBD é “mais forte” que aquela verificada para a proteína GFP.

Tabela 10 - Dados de capacidade de adsorção da Proteína RBD em nanopartículas de ouro.

Co (ug/uL de RBD)	C (ABS 280 nm)	Q (AuNP sol. ug/ul)	C AuNP (ug/uL)	Q AuNP (ug/uL)
1 (0)	0	0	0	0
2 (4)	0	0	0	0,11
3 (8)	0,012	0,49	0,0098	0,23
4 (12)	0,066	2,68	0,0536	0,34
*5 (16)	0,084	3,41	0,0683	0,45
6 (18)	0,109	4,43	0,0886	0,51
7 (22)	0,187	7,60	0,1520	0,62

Volume de AuNPs de 22 uL em todos os ensaios (volume final de 50 uL). Tempo de reação de 1 hora;

Figura 29 - Capacidade de adsorção da Proteína RBD em AuNPs, segundo o modelo de Langmuir.



É importante ressaltar que ensaios preliminares de adsorção de outras proteínas estruturais do Coronavírus também foram realizados. Estes estudos demonstraram que as nanopartículas de ouro complexadas às proteínas estruturais do vírus, C-terminal e N-terminal, foram capazes de interagir eficientemente com anticorpos neutralizantes (sorológico) contra o Covid-19 por meio de um ensaio ELISA. Estes estudos foram realizados por colaboradores do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP). Estes estudos demonstraram que o reconhecimento da proteína (antígeno) não foi afetado quando as proteínas são incorporadas às nanopartículas de ouro, o que indica que há uma ligação promissora entre a proteína e a NP com condições favoráveis para absorvê-la e ser reconhecida por anticorpos específicos.

Uma vez que estes estudos iniciais foram promissores, deu-se continuidade à colaboração com o ICB na forma de um estudo com ensaio *in vivo* (em modelo animal, camundongos) utilizando-se AuNPs funcionalizadas com a proteína RBD, a mesma apresentada nos estudos de adsorção. Os resultados destes estudos, que poderão ser incluídos neste texto a critério da banca examinadora, foram interessantes e indicam potencialidade de aplicação de AuNPs como carreadoras de antígenos tendo em vista o desenvolvimento de novas plataformas vacinais. A mesma quantidade de proteína RBD (10 ug), quando adsorvida nas AuNPs sintetizadas neste trabalho, e inoculada em três doses nos animais, foi capaz de gerar em média aproximadamente 10 vezes mais anticorpos totais (IgG) e duas vezes mais anticorpos neutralizantes do que a proteína RBD em solução, sem estar adsorvida em AuNPs.

5.4. ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS HELA E U-87 COM NANOPARTÍCULAS REDUZIDAS POR CITRATO DE SÓDIO

Como colocado anteriormente, um dos objetivos do presente trabalho é sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro e funcionalizá-las com desintegrinas de modo a funcionarem como carreadores para neutralização de células tumorais que superexpressem integrinas $\alpha\beta3$ em suas membranas celulares. Nesse contexto, um primeiro estudo de avaliação da capacidade de AuNPs serem funcionalizadas com desintegrinas visando ao direcionamento

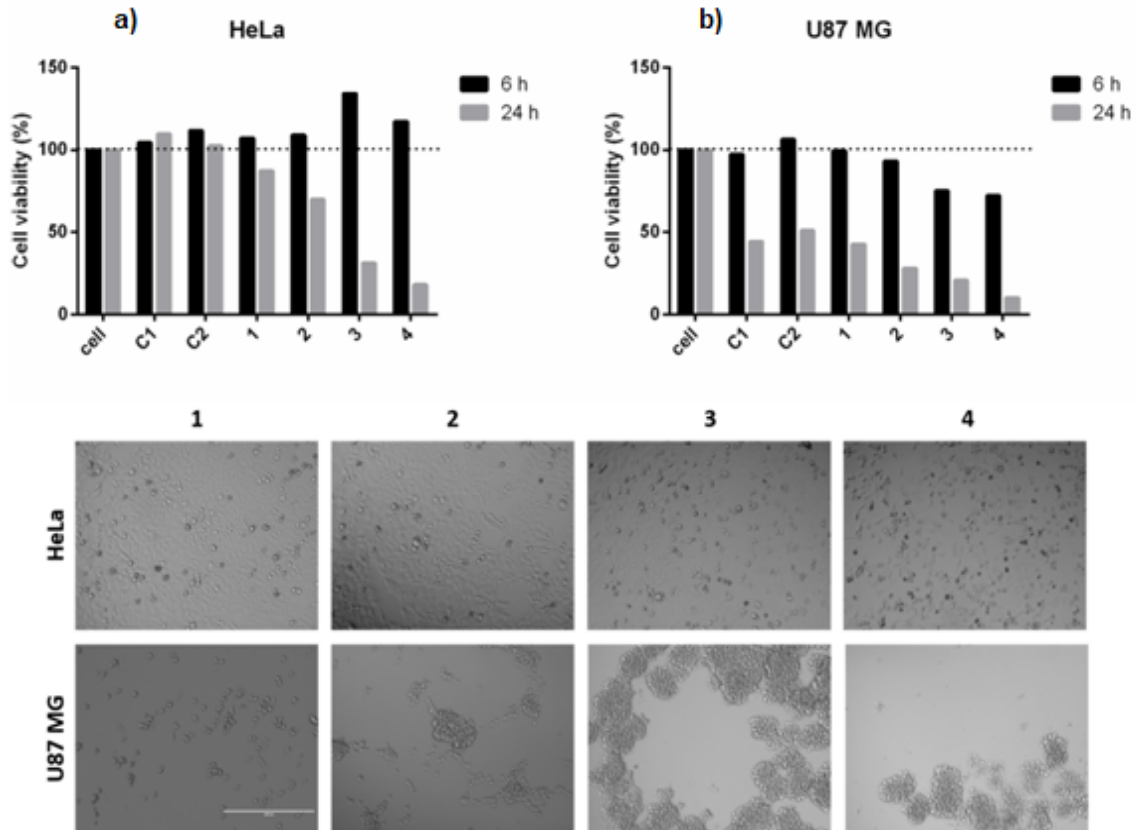
para células que superexpresssem esse receptor foi realizado usando-se, em um primeiro momento, AuNPs sintetizadas via citrato de sódio.

Para essa avaliação, as proteínas Echistatina (desintegrina) e GFP, produzidas no Instituto Butantan, foram adsorvidas em diferentes razões mássicas à superfície das nanopartículas de ouro (Tabela 12). A reação de adsorção foi conduzida em tampão PBS a pH 7,2. Ensaio realizado no laboratório já demonstraram a alta capacidade de interação entre as AuNPs e proteínas (GFP), com capacidades de ligação próximas à 550 mg de proteína por mililitro de solução de ouro coloidal produzido via redução por citrato (dados não apresentados). A hipótese por trás da utilização da proteína GFP na composição da nanopartícula está na possibilidade de acompanhamento da interação, e possível internalização na célula, via microscopia de fluorescência, já que se trata de uma proteína verde fluorescente (proteína repórter).

Como apresentado na Figura 30 foi possível observar diferença perceptível no padrão de resposta celular entre HeLa e U-87, mostrando-se proporcional à concentração crescente de Echistatina em cada poço correspondente aos diferentes complexos (1, 2, 3 e 4). A célula U-87 demonstra alta susceptibilidade à Echistatina que perde rapidamente o formato alongado e forma agregados ou grumos, perdendo aderência à placa. A formulação 4 é de maneira geral bem nociva as células. Já a célula HeLa é reconhecidamente pouco susceptível à Echistatina, pela baixa concentração de integrinas na membrana celular.

A formulação (C2 – controle 2) não possui Echistatina, entretanto pela análise da célula U-87 (gráfico – b) manifestou citotoxicidade. Será necessária a repetição do ensaio para confirmar se a nanopartícula de ouro, considerada até então uma partícula pouco tóxica de acordo com a literatura, é capaz de causar dano à célula ou se o dado obtido reflete apenas um erro de manipulação. Ainda assim, os ensaios já indicam sucesso na capacidade de direcionamento das NPs pela Echistatina, tendo as células U-87 se mostrado bem mais suscetíveis às nanopartículas uma vez que possuem muito mais receptores integrina associados à membrana que as células HeLa.

Figura 30 – Ensaio de transfecção e viabilidade celular com células HeLa (controle) e células U87 MG utilizando-se complexos NPAus-GFP-Echistatina em diferentes relações mássicas, segundo descrito na Tabela 12.



Teste de viabilidade celular calculada, em % de células viáveis, em dois tempos de análise, 6h e 24h após a transfecção com as formulações, sendo o controle negativo (100%) composto por célula não transfectadas e o reagente tetrazólio (cell). C1 indica controles (células) que receberam apenas a Echistatina (sem NPs e GFP) e C2 indica células que receberam as NPs e GFP mas não receberam a Echistatina. Microscopia de óptica de células U-87 e HeLa frente às formulações de Echistatina + GFP nas diferentes concentrações.

6. CONCLUSÃO

Com base nos experimentos realizados, podemos concluir que as nanopartículas de ouro obtidas através do método de redução por aminoácidos não se mostraram interessantes devido ao elevado tamanho e baixa estabilidade coloidal. No entanto, a metodologia mais tradicional de redução dos sais de ouro por meio de citrato de sódio apresentou boa perspectiva para a síntese de AuNPs com características para atuarem como carreadoras de proteínas para fins terapêuticos. Este método gerou nanopartículas com tamanhos em torno de 35 a 43 nm e potencial zeta mais altos (em módulo), apresentando maior estabilidade. Estas AuNPs apresentam capacidade de adsorção à proteínas, apresentando ligação eficiente e não promovendo perda de sua função, uma vez que a proteína GFP mantém sua emissão de fluorescência e as proteínas do Coronavírus foram reconhecidas como antígeno frente à anticorpos específicos neutralizantes, mesmo quando adsorvidas às nanopartículas de ouro. Isso indica um potencial interessante de aplicação das AuNPs como carreadoras de antígenos em plataformas vacinais, uma vez ampliados os estudos. Por fim, os ensaios em células tumorais, ainda que preliminares, indicam potencial capacidade de direcionamento das NPs para células cancerosas por meio da proteína Echistatina ancorada à sua superfície, tendo as células U-87 se mostrado mais suscetíveis às nanopartículas uma vez que possuem muito mais receptores integrina associados à membrana celular que as células HeLa. Isso também abre a possibilidade de utilização de AuNPs como plataforma de ancoragem e transporte de biomoléculas com a finalidade de combate à tumores.

7. REFERÊNCIAS

AROSIO, D; CASAGRANDE, C; MANZONI, L. Integrin-Mediated Drug Delivery in Cancer and Cardiovascular Diseases with Peptide-Functionalized Nanoparticles. *Current Medicinal Chemistry*, vol, 19, 3128-3151. 2012.

BACHMANN et al, Cell adhesion by integrins. *Rev* 99: 1655–1699. 2019

BONET, F, F; HERNANDEZ, F, J. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. *Revista Científica da FMC*. Vol. 9, nº 2, 2014.

BONIFÁCIO, L. S. Processos de Agregação e Fusão de Nanopartículas de Ouro: uma abordagem química. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 2006

BREGOLI et al. Nanomedicine applied to translational oncology: a future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol 12, pg 81-103. 2016.

BUDEL, Desenvolvimento de nanopartículas de polihidróxibutirato carregadas com proteínas recombinantes do vírus SARS-CoV-2. <https://www.acervodigital.ufpr.br/handle/1884/77762>

CARVALHO, A; FERNANDES, A, R; BAPTISTA, P. V. Nanoparticles as Delivery Systems in Cancer Therapy: Focus on Gold Nanoparticles and Drugs. *Nano science and Nanotechnology in Drug Delivery*, pg 257-295. 2019.

CHEN; NIU; CHEN. Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin $\alpha\beta_3$. *Journal Theranostics*. Vol, 6. 2016.

CHUNG et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. 2005.

CUNHA, G. Nanociência: um mundo! Nano química. 2020.

http://allchemy.iq.usp.br/oqsp/OQSP-2020-2-Nanoquimica-Giuseppe_Cunha.

DEMIRCIOGLU, F; DILKE, K, H. $\alpha\beta_3$ Integrin and tumour blood vessels — learning from the past to shape the future. *Cell Dynamics*. *Current Opinion in Cell Biology* 42:121–127. 2016.

DOTTO, G, L et al. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 7, 1193-1199, 2011.

DOUSARI, A. S; MOGHADAM, M. T; SATARZADEH, N. A New Coronavirus Disease. Infection and Drug Resistance Journal. 2022. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2147/IDR.S259279>

FAYAD et al. Nanopartículas obtidas a partir da proteína isolada de soja (spi) pelo método de coacervação em água: efeito da força iônica e das concentrações de proteína e surfactante. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

FERRANDO et al. Gold nanoparticle-based platforms for vaccine development. Drug Discovery Today: Technologies. (2020) 38, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.001>

GAGEN et al. Activated avb3 Integrin Regulates avb5 Integrin–Mediated Phagocytosis in Trabecular Meshwork Cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science. Vol. 54, n.07. 2013.

GUO, et al. Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics. Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics. International Journal of Nanomedicine. Volume 12, 6131–6152. 2017.

HAN, L; GUO, J, ZHANG, J. Pharmacokinetics and biodistribution of polymeric micelles of paclitaxel with Pluronic P123. Acta Pharmacologica Sinica 27, 747–753. 2006.

HOSSAIN, 2021. A study on understanding potential gold and silver nanoparticle: an overview. International Journal of Nanoscience. vol 20, nº 1. 2021.

Huang, H. Yang, X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. Carbohydrate Research. Vol 339, pg 2627-2631. 2014.

JAHANGIRIAN et al. A review of small molecules and drug delivery applications using gold and iron nanoparticles. International Journal of Nanomedicine, Vo 14, pg 1633-1657. 2019.

JR, M, A et al. Preparação De Nanopartículas De Prata E Ouro: Um Método Simples Para A Introdução Da Nanociência Em Laboratório De Ensino. Universidade Estadual de Campinas. 2012.

JUNIOR, M.J; VARANDA, L. C. O Mundo dos Coloides. QUÍMICA NOVA NA ESCOLA O Mundo dos Colóides Nº 9, MAIO 1999.

KONG et al. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. Review Molecules. 22, 1445; 2017.

KUMAR, S; GANDHI, K,S; KUMAR, R. Modeling of Formation of Gold

Nanoparticles by Citrate Method. Department of Chemical Engineering, Indian Institute of Science, India. Ind. Eng. Chem. Res. 46, 3128-3136. 2007.

KVITEC et al. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). Journal Physical Chemistry. Republica Checa. Vol. 112, 5825-5834. 2008.

LASINSKA, I; Mackiewicz, J. Integrins as A New Target for Cancer Treatment. Journal Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. Vol 19, pg 580-586. 2019.

LAZAROVICI, P; MARCINKIEWICZ, C; LELKES, P, I. From Snake Venom's Disintegrins and C-Type Lectins to Anti-Platelet Drugs. Toxins 2019, 11, 303; 2019.

LI et al. Gold Nanoparticle-Mediated Targeted Delivery of Recombinant Human Endostatin Normalizes Tumour Vasculature and Improves Cancer Therapy. 2016. Scientific Reports, vol 6, nº 30619. 2016.

LIU, WANG, CHEN. Integrin $\alpha\beta 3$ -Targeted Cancer Therapy. Drug Dev Res, 69(6): 329-339. 2008.

MANUAL USER. ZETA SIZER NANO SERIES. Malvern. MAN0485 Issue 1.1. 2013.

MARUYAMA, FUJIMOTO, MAEKAWA. Synthesis of gold nanoparticles using various amino acids. Journal of Colloid and Interface Science, vol 447; Pg 254-257. 2015.

MILANEZE, B.A. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com resina de Virola oleifera e avaliação do seu efeito antibacteriano. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 2015.

MIESZAWSKA, A, J et al. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. 2013.

MONTENEGRO et al. Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. Biochimie 94; 1812e1820. 2012.

NASCIMENTO, F. R et al. Aspectos Teóricos e ambientais. Universidade Federal do Ceará. 2014.

NETO, Uso de Nanopartículas Metálicas na Vacinologia: Implicações para o Desenvolvimento de Vacinas contra Doenças Infecciosas. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS REDE PRÓ CENTRO-OESTE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE. 2018.

NOMURA et al. Espalhamento Dinâmico de Luz. Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

PALMA, M. M. L. Desenvolvimento de nanopartícula metal-proteína para entrega de DNA em estudos de terapia genica e vacinação genica. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2017.

PAREJO, STUPP, RUEEG. Are Integrins Still Practicable Targets for Anti-Cancer Therapy? Review Cancers. 2019.

PEREIRA, F. C; ZANONI, M. V. B; UGO, P. Características ópticas e morfológicas de nanoestruturas de ouro. 2007.

PEREIRA, M. K. Ressonância Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Física. Dissertação de Mestrado. 2009.

PILLAI, G. Nanotechnology Toward Treating Cancer: A Comprehensive Review. Cap 9. Nano science and Nanotechnology in Drug Delivery, pg 221-2256. 2019.

PIELLA, J; BASTUS, N, G; PUNTES, V. Size-dependent Protein-Nanoparticle Interactions in Citrate-stabilized Gold Nanoparticles: The Emergence of the Protein Corona. Protein Corona. 2016.

PRADO, A. R. Polarização plasmônica de superfície em nanopartículas de ouro. Encontro Científico de Física Aplicada. Blucher. p. 77-78. 2014.

QUINTÃO, J. C. Síntese de nanopartículas de ouro em nanoestruturas macromoleculares e em sistemas aquosos bifásicos. Universidade Federal de Viçosa. 2014.

RIVAS-MERCADO; GARZA-OCANÃS. Disintegrins obtained from snake venom and their pharmacological potential. Medicina Universitária, pg 32-37. 2017.

ROTELO, V. M; KIM, C; DUNCAN, B. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. 2010.

ROWINSKY, E; ROSS, C. Paclitaxel (taxol) drug therapy. 1995.

SANTOS, M.L. Fitocompostos com atividade antineoplásica – paclitaxel e seus derivados. PORTO, 2013

SELVAKANNAN, P. Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. Journal Colloid Interface. Vol 269, pg 97-102. 2004

SELBO et, al. Photochemical internalization provides time and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecule. Journal of Controlled Release. 2010.

SILVA et al. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha v \beta 3$. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian. Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 43, n. 1. 2007

SILVA, G, T, S, T. Estudo da interação entre nanopartículas de ouro, l. Triptofano e organilcalcogênios. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Grande Dourados. 2015.

SILVA, A. A. SÍNTESE E ESTABILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS E COSMÉTICOS. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 2016.

STOBIECKA, M; HEPEL, M. Double-shell gold nanoparticle-based DNA-carriers with poly-L-lysine binding surface. 2011.

TAN, N; YANG, L; WANG, D, I. Uncovering the Design Rules for Peptide Synthesis of Metal Nanoparticles. Journal of the American Chemical Society. 2010.

TURCKEVICH, H, COOPER, P STEVENSON, A, D, HILLIE, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. 1951.

XIONG et al. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin α V β 3 in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. Science 296, 151. 2002.

ZARABI, M, F; ARSHADI, N. Preparation and Characterization of Gold Nanoparticles with amino Acids, Examination of their Stability. Journal Clin Biochemical, pg 306-314. 2014.

JAZAYERI et al. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. Sensing and Bio-Sensing Research, vol 9, pg 17-22. 2016.

FILHO, P. C. S; SERRA, O. A. METODOLOGIAS DE SÍNTESE EM FASE LÍQUIDA PARA A OBTENÇÃO DE NANOMATERIAIS INORGÂNICOS À BASE DE TERRAS RARAS. Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Quim. Nova, Vol. 38, No. 5, 679-696, 2015.

SANTOS, N. T. Nanopartículas de ouro como sistema de liberação de droga associada a Berberina : síntese e caracterização. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. 2013.

SANTOS, D.I.V; GIL, E.S. Fluorimetria Na Análise Farmacêutica: Uma Revisão. Revista Eletrônica de Farmácia. Vol 8(1), 24-38. 2010.

SANTOS, J.F.L. Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. 2016.

SEKIMUKAI et al. Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs. Microbiol Immunol vol. 1. pg. 64 2020.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168429/>

RAZAK, K. R. A. et al. K.R. Abdul, S.R. Makhsin, N.D. Zakaria, N.M. Nor,
Gold nanoparticles for diagnostic development, in: Sustain. Diagnostics Low
Resour. Areas,
2017. https://www.researchgate.net/publication/331111795_Gold_nanoparticles_for_diagnostic_development/link/5c6648aaa6fdccb608c3c93e/download
