

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS E MATERIAIS AVANÇADOS

ELISÂNGELA BELLETI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM
POLI (ETILENO GLICOL) DITIOL PARA ESTUDOS DE LUMINESCÊNCIA E
FLUORESCÊNCIA**

Santo André

2019

Elisângela Belleli

Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com poli (etileno glicol) ditiol para estudos de luminescência e fluorescência.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nanociências e Materiais Avançados da Universidade Federal do ABC, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nanociências e Materiais Avançados.

Orientadora: Iseli Lourenço Nantes Cardoso

Santo André

2019

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Belleti, Elisângela

Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com poli
(etileno glicol) ditioI para estudos de luminescência e
fluorescência / Elisângela Belleti. — 2019.

46 fls.

Orientadora: Iseli Lourenço Nantes Cardoso

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC, Programa
de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados, Santo
André, 2019.

1. Nanopartículas. 2. PEG. 3. Fluorescência. 4.
Bioluminescência. I. Lourenço Nantes Cardoso, Iseli. II. Programa
de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados, 2019.
III. Título.

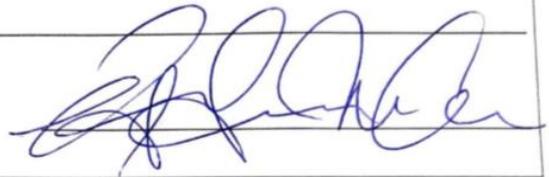
Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do(a) autor(a) e com a anuência do(a) orientador(a).

Santo André/SP

17 de outubro de 2019

Assinatura do(a) autor(a): _____

Assinatura do(a) orientador(a): _____

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and flourishes, is written over a horizontal line. The signature is positioned to the right of the 'Assinatura do(a) orientador(a):' label.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Fundação Universidade Federal do ABC

Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata, ELISÂNGELA BELLETI realizada em 13 de Setembro 2019:



Prof.(a) Dr.(a) MARCIA TSUYAMA ESCOTE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Membro Titular



Prof.(a) Dr.(a) PATRÍCIA TARGON CAMPANA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) ALEXANDRE JOSE DE CASTRO LANFREDI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) CAROLINA GREGORUTTI DOS SANTOS
OUTRA - Membro Suplente



Prof.(a) Dr.(a) ISELÍ LOURENCO NANTES CARDOSO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Presidente

*“Between the probable and proved there yawns
A gap. Afraid to jump, we stand absurd,
Then see behind us sink the ground and, worse,
Our very standpoint crumbling. Desperate dawns
Our only hope: to leap into the Word
That opens up the shuttered universe.”*
— **Sheldon Vanauken**

Agradecimentos

A Deus por me conceder a oportunidade de viver mais uma experiência, nessa curta jornada que é a vida.

Meus sinceros agradecimentos aos meus amigos do Programa de Nanociências e Materiais Avançados: Adrienne, Reis, Hebert, David, Carin, Juliana e Carol por serem companheiros de laboratório tão especiais e peculiares, obrigada por estarem nesta fase da minha vida.

A minha orientadora Iseli Lourenço Nantes Cardoso, pela oportunidade concedida, pelo conhecimento compartilhado. Meu respeito e admiração.

Aos colaboradores de trabalho: Professor Lanfredi - UFABC, Professor Dr. Viviani Vadin, e Vanessa da UFSCAR Sorocaba; A Professora Dra. Patricia Targon Campana – Universidade de São Paulo por todo empenho e dedicação, por acreditar neste trabalho.

Aos meus professores do mestrado pelo conhecimento transmitido e constante apoio.

A todos os técnicos da CEM – UFABC, na orientação e disponibilidade durante todos os experimentos.

A UFABC e a CAPES pelo apoio e colaboração.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

LISTA DE SIGLAS

MNPs: Nanopartículas metálicas

Nps: Nanopartículas

AuNP: Nanopartículas de ouro

PEG: poli (etileno glicol)

PEG (SH)₂: poli (etileno glicol) ditiol 8000

NBD: nitro benzoxadiazol

PS: Fosfatidilserina

18:1 NBD PS: Lipídio com marcador fluorescente localizado na cabeça (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl));

MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura

TEM: Microscópio Eletrônico de Transmissão

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
2.Revisão Teórica	14
2.1.Nanopartículas	14
2.1.1.Síntese de nanopartículas de ouro	16
3.Fluorescência	17
4.Luminescência.....	22
4.1. Bioluminescência	22
5.OBJETIVOS	25
5.1.Objetivo Geral	25
5.1.1. Objetivos específicos	25
6.MATERIAIS E MÉTODOS	26
6.1. Materiais	26
6.2. Métodos.....	27
6.2.1. Síntese e caracterização de nanopartículas.	27
6.2.2. Espectroscopia UV-Vis.....	27
6.2.3. Espectroscopia de FTIR.....	28
6.2.4. Espectroscopia de Fluorescência.	28
6.2.5.Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	28
6.2.6.Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	29
6.2.7. Expressão e purificação da luciferase.	29
6.2.8. Atividade Luminescente.	29
6.2.9 Espectros de bioluminescência.....	29
7.RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
7.1. Caracterização das Nanopartículas	31
7.2. Fluorescência	35
7.3.Bioluminescência	39
CONCLUSÃO.....	46
9. REFERÊNCIAS	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Nanoestruturas na antiguidade.....	15
Figura 2. Diagrama de Jablonski.....	19
Figura 3. O fenômeno de ressonância plasmônica.....	20
Figura 4: Espectro eletromagnético. Ilustração adaptada de Peter Hermes Furian.....	23
Figura 5. Representação da Equação geral da bioluminescência.....	23
Figura 6. Larvas de coleópteros (Lampyridae)	24
Figura 7. Esquema representativo da síntese de AuNPs em uma fase	27
Figura 8. Espectro UV-visível da solução de (PEG(SH) ₂ AuNPs)	32
Figura 9 . Imagens de microscopia eletrônica de Varredura - NPs isotrópicas estabilizada pela síntese e revestida com PEG ditio 8000 (HAuCl ₄ .3H ₂ O + HS O n SH).....	34
Figura 10. Histograma das AuNPs tratadas com L-cisteína.	34
Figura 11. NBD PS 18:1 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)	35
Figura 12. Espectros de fluorescência e curva de titulação do fluoróforo NBD PS 18:01 em tampão.....	36
Figura 13. Espectro de fluorescência e curva de titulação do NBD em tampão versus em NBD	38
Figura 14. Espectros de Bioluminescência das enzimas RE e PY.....	40
Figura 15. Espectro UV-visível da suspensão coloidal de (PEG(SH) ₂ AuNPs)	41
Figura 16. Espectros FTIR de soluções tamponadas de luciferase e de soluções coloidais de nanopartículas metálicas.....	42
Figura 17. Luminescência do sistema luciferina/luciferase.....	44

RESUMO

O presente trabalho trata da caracterização da síntese de nanopartículas metálicas, especificamente de ouro (HAuCl_4) com o emprego de PEG (SH)₂ (poli (etileno glicol) ditiol 8000) como agente redutor e de recobrimento para estudos de luminescência e fluorescência. O PEG(SH)₂ possui dois grupos tióis nas extremidades da cadeia polimérica que apresentam poder redutor para a conversão dos íons ouro em ouro metálico nanoparticulado, em uma única e rápida etapa de síntese. Quando magnetita nanoparticulada é adicionada à solução do polímero antes da adição de sal de ouro, nanopartículas híbridas de ouro e magnetita também podem ser obtidas. A síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) com PEG (SH)₂, resulta em estruturas cristalinas de cerca de 15 nm de diâmetro que se organizam como agregados supramoleculares recobertos por PEG (SH)₂ estabilizado por meio de ligação tiol-ouro. O recobrimento pelo polímero pode ser substituído por L-cisteína o que leva à desagregação das AuNPs. Para substituir o recobrimento polimérico por L-cisteína, as AuNPs são lavadas com solução aquosa de L-cisteína, preparada em água deionizada. As AuNPs recobertas pelo polímero (PEG(SH)₂AuNPs), e as AuNPs híbridas com magnetita foram testadas quanto aos efeitos em sistemas luminescentes (luciferina/luciferase) e fluorescentes, ou seja, lipídios com marcadores fluorescentes tais como 18:1 NBD PS (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl). No sistema luciferina/luciferase, PEG(SH)₂AuNPs e CysAuNPs aumentaram a bioluminescência da amostra, enquanto as nanopartículas híbridas com magnetita diminuíram a bioluminescência, resultados esses que podem ser devido a supressão e/ou perda de atividade, possibilidades que necessitam ser melhor elucidadas. A estabilização decorre da presença dos agentes de recobrimento contendo grupos SH que atuam como antioxidantes. Além da estabilização, a associação da enzima com as nanopartículas permite reciclagem da enzima, por meio de centrifugação e ressuspensão. As PEG(SH)₂AuNPs foram também utilizadas para a associação com o lipídeo com marcador fluorescente 18:1 NBD PS que possui o fluoróforo localizado na cabeça do fosfolipídio. .

Associados às PEG(SH)₂AuNPs, os resultados sugerem que a microvizinhança das cabeças polares dos NBDs sofrem as mesmas mudanças seja em tampão seja na solução de nanopartículas. A interação entre este NBD PS e as NP ocorre pelas caudas e não pelas cabeças.

Palavras-chave: Nanopartículas, PEG, Fluorescência, Bioluminescência

ABSTRACT

The present work deals with the characterization of the synthesis of metal nanoparticles, specifically gold (HAuCl₄) with the use of PEG (SH) 2 (poly (ethylene glycol) dithiol 8000) as a reducing and coating agent for luminescence and fluorescence studies. PEG (SH) 2 has two thiol groups at the ends of the polymer chain that have reducing power for the conversion of gold ions to nanoparticulate metallic gold in a single and rapid synthesis step. When nanoparticulate magnetite is added to the polymer solution prior to the addition of gold salt, hybrid gold and magnetite nanoparticles can also be obtained. Synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) with PEG (SH) 2 results in crystalline structures of about 15 nm in diameter that organize themselves as PEG (SH) 2 coated supramolecular aggregates by thiol-gold bonding. The polymer coating can be replaced by L-cysteine which leads to the breakdown of AuNPs. To replace the polymeric coating with L-cysteine, AuNPs are washed with aqueous L-cysteine solution prepared in deionized water. Polymer coated AuNPs (PEG (SH) 2AuNPs), and hybrid magnetite AuNPs were tested for effects on luminescent (luciferin / luciferase) and fluorescent systems, ie lipids with fluorescent markers such as 18: 1 NBD PS (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N- (7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl. In the luciferin / luciferase system, PEG (SH) 2AuNPs and CysAuNPs increased bioluminescence of the sample, while hybrid magnetite nanoparticles decreased bioluminescence, which may be due to suppression and / or loss of activity, possibilities that need to be further elucidated. The stabilization results from the presence of the coating agents containing SH groups. In addition to stabilization, the association of the enzyme with the nanoparticles allows the enzyme to be recycled by centrifugation and resuspension. The PEG (SH) 2AuNPs were also used to associate the lipid with fluorescent marker 18: 1 NBD PS that has the fluorophore located on the phospholipid head. .

Associated with PEG (SH) 2AuNPs, the results suggest that the NBDs' polar heads microregion undergoes the same changes in either buffer or nanoparticle solution. The interaction between this NBD PS and the NP occurs by the tails and not by the heads.

Keyword: Nanoparticles, PEG, Fluorescence, Bioluminescence

INTRODUÇÃO

Durante décadas a Nanotecnologia tem se desenvolvido e ao mesmo tempo gerado enormes expectativas de aplicações revolucionárias.

Em 2018, no Brasil, como iniciativa da Confederação Nacional da Indústria (CNI), Instituto Euvaldo Lodi (IEL) e outras entidades foi implementado o Projeto Indústria 2027- mobilização empresarial pela inovação (COUTINHO, 2018), o qual considera a nanotecnologia como uma das oito áreas de inovação essenciais para o desenvolvimento do país. Esse estudo enfatiza a importância desse setor devido sua transversalidade, ou seja, utiliza-se de diferentes conhecimentos e tecnologias os quais possibilitam que áreas como medicina, química, física e biologia sejam integradas em projetos de pesquisa e desenvolvimento, com aplicações também em indústrias de diferentes setores, como a têxtil, automotiva, de alimentos, eletrônica, entre outras. Assim, observa-se a importância e a crescente demanda social e industrial pelo desenvolvimento de sistemas nanotecnológicos.

Até o momento, uma enorme diversidade de métodos de síntese de nanoestruturas das mais diversas formas e tamanhos tem sido desenvolvida (EUSTIS; EL-SAYED, 2006), mas para o futuro é necessário ir além das nanoestruturas isoladas e suas associações estáticas e direcionar os esforços para os sistemas formados por diferentes nanopartes que interagem e se comunicam. A literatura atual (GRZYBOWSKI; HUCK, 2016) aponta as seguintes vantagens para esses sistemas: possuem autonomia sem a necessidade de conexões elétricas ou óticas, podem ser dinâmicos e reconfiguráveis e atuam como nanomáquinas carregando informação, massa ou energia. Para que haja o desenvolvimento desses nanosistemas é interessante ter como inspiração as cascatas de ativação metabólica dos sistemas biológicos, as quais são definidas como um mecanismo altamente eficiente caracterizado por uma série de reações químicas consecutivas e simultâneas que formam as redes metabólicas responsáveis pelo crescimento e sobrevivência do organismo vivo. Assim, numa célula viva, por meio de um sistema de basicamente uma única etapa, reações de várias etapas são catalisadas por inúmeras enzimas adaptadas pela evolução em um ambiente aquoso (MUSCHIOL et al., 2015).

Nesse contexto, reações em cascata catalítica tornaram-se uma das mais ativas áreas de pesquisa em síntese orgânica, e de modo particular, a aplicação de bionanoestruturas, isso é, nanoestruturas e biomoléculas combinadas de diferentes maneiras, empregadas como novos nanocatalisadores (FILICE; PALOMO, 2014). De acordo com essa perspectiva futura, desenvolvemos um método de uma etapa para a síntese de nanopartículas de ouro que se mostraram promissoras para o aumento da Bioluminescência da Luciferase e fluorescência de determinados fluoróforos. No presente estudo, executamos um estudo sistemático sobre o efeito das nanopartículas de ouro revestidas com PEG, poli (etileno glicol) ditiol 8000 sobre o lipídio com marcador fluorescente 18:1 NBD PS (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)), e associadas ao complexo enzimático Luciferase-luciferina.

2.Revisão Teórica

2.1.Nanopartículas

Nanopartículas (NPs) e outras nanoestruturas metálicas envolvem, pelo menos em uma dimensão, de dezenas a centenas de dezenas de átomos de metais os quais, nesse arranjo, possuem características bem diferenciadas dos seus átomos individuais ou do bulk, tais como estrutura eletrônica específica (densidade local de estados), grandes energias de superfície, confinamento quântico, excitação de plasmons de superfície e ordenação de curto alcance. As propriedades peculiares dessas nanoestruturas, dependentes de forma e tamanho, são observadas em nível eletrônico, óptico, catalítico e magnético o que possibilita variadas aplicações (SCHRÖFEL et al., 2014; ALVAREZ et al., 2017).

Considerando-se o contexto histórico, o comportamento óptico das NPs metálicas tem fascinado a humanidade desde a antiguidade. Na figura XX, visualiza-se a Taça de Lycurgus (século 4 a.C), talvez o exemplo mais antigo conhecido de utilização de nanoestrutura. Ainda em 1857, Faraday ao estudar a interação da luz em soluções coloidais de ouro atribuiu a cor vermelha ao ouro nessa forma, contrastando com o já conhecido material na forma macroscópica, um sólido dourado dúctil e com brilho metálico. Posteriormente, a análise do material dessa taça revelou que ele contém uma pequena quantidade de nanocristais (~ 70 nm) de Ag e Au. Atualmente é conhecido que o ouro sólido quando dissolvido em água-régia, uma solução de ácido nítrico e ácido clorídrico, gera uma solução de ácido tetracloroáurico ($H[AuCl_4]$) e esse, ao ser reduzido em solução, resulta na formação de AuNPs. A coloração da suspensão coloidal de AuNPs varia do vermelho ao roxo azulado dependendo do tamanho, forma e estado de agregação das nanopartículas (AUSTIN et al., 2014).



Figura 1. Nanoestruturas na antiguidade: taça de Lycurgus (4 a. C) exposta no Museu Britânico – Londres. A direita a comparação entre a taça na sombra e na luz.

Tais fenômenos de alteração de cor de acordo com a incidência de luz ou da interação da luz com a matéria, como na figura 1, podem ser observados por técnicas bem conhecidas. Para observar o fenômeno de absorção de luz é utilizada a técnica de espectroscopia UV-visível que é útil para quantificar e qualificar substâncias no entanto quando ocorre absorção de um fóton de luz infravermelha, a energia não é suficiente para promover uma transição eletrônica, porém promove vibrações moleculares específicas, conforme o comprimento de onda absorvido, o que também é utilizada na identificação de substâncias por meio da técnica de espectroscopia com infravermelho (PENNER, 2010).

Nanopartículas de ouro, prata e semicondutoras exibem propriedades ópticas peculiares que são resultado direto da interação da radiação eletromagnética (região espectral do ultravioleta ao infravermelho) com suas propriedades eletrônicas. A diversidade de cores das soluções coloidais dessas NPs em função do tamanho, é explicada pelo efeito de confinamento quântico e a própria origem física dessas cores, à ressonância de plasmons de superfície localizado (MARTINS; TRINDADE, 2012; NETTO-FERREIRA, 2015).

2.1.1. Síntese de nanopartículas de ouro

Nanoestruturas podem ser obtidas por meio de métodos físicos (top down) e químicos (bottom up). Nos métodos físicos utiliza-se de processos tais como moagem, têmpera, fotolitografia, decomposição térmica, irradiação, difusão, entre outros. Os métodos químicos envolvem espécies moleculares em reações químicas para gerar o crescimento de aglomerados, síntese eletroquímica ou uso de elementos biológicos na síntese (XIA et al., 2003). A síntese química de nanopartículas metálicas em solução é realizada com um sal metálico e agente redutor e envolve processos de nucleação e crescimento de nanopartículas. Esse processo de síntese apresenta três etapas gerais: redução do íon metálico, formação de aglomerados metálicos (nucleação) e crescimento para formar uma MNP estável final com uma forma e tamanho específicos (THANH; MACLEAN; MAHIDDINE, 2014). A existência de diversos métodos de síntese de nanopartículas de ouro em solução têm motivado estudos das propriedades dependentes da forma intrínseca associados com os parâmetros termodinâmicos e cinéticos, o tipo de agente redutor e o meio tamponante.

Para o preparo de nanopartículas de ouro (AuNPs), têm sido desenvolvidos e aprimorados métodos físicos, químicos e eletroquímicos (DREADEN et al., 2012). Atualmente, as abordagens químicas mais comuns envolvem a redução do cloreto de ouro em solução aquosa utilizando agentes redutores suaves e, nesta condição, a reação química direciona a cinética do crescimento da AuNP e envolve um modelo de síntese em várias etapas. Assim, íons Au^{3+} são introduzidos no meio reacional a partir do ácido tetracloroáurico, ($HAuCl_4$) que é a forma ácida do cloreto de ouro (III), em seguida há a redução de Au^{3+} para Au^{1+} seguido por dismutação de Au^{1+} para Au^0 e Au^{3+} . Desse modo, como o sistema é então submetido a uma reação com supersaturação do soluto há a indução da etapa de Nucleação na qual inicia o processo de cristalização, originando as primeiras partículas nucleadas, as quais começam a crescer. Na fase seguinte, de Estabilização as nanopartículas possuem alta energia superficial e promovem então o crescimento e agregação para diminuir a energia total do sistema (FERREIRA; RANGEL, 2009).

As nanopartículas são um componente essencial no emergente campo da terapia e diagnóstico combinados. Quando implantadas *in vivo*, esses materiais são tipicamente protegidos do sistema imunológico por poli (etileno glicol). Já é conhecido que para melhorar a estabilização de nanopartículas sob condições extremas, o estado de dispersão do colóide de metais deve ser mantido através de estabilização estérica por revestimento das MNPs com polímeros contendo tiol. Entre estes polímeros, o poli (etileno glicol) tiol e ditiol, são mais amplamente usado. Acredita-se que as cadeias de PEG hidrofílicas, densamente compactadas reduzam fortemente as forças de atração entre as partículas, bem como uma repulsão estérica forte para aproximar componentes biológicos, tais como proteínas e anticorpos do plasma. Isso, por sua vez, suprime a fagocitose e a subsequente eliminação da corrente sanguínea ou do corpo (LEVENTIS; GRINSTEIN, 2010).

O método aqui proposto permite a síntese de AuNPs em condições de bancada (condições ambientes) utilizando solução de sal de ouro, solução tampão de fosfato de sódio e HEPES e o PEG ditiol em apenas uma etapa.

3.Fluorescência

A fluorescência é a emissão de radiação eletromagnética que normalmente ocorre como luz visível, a qual é causada pela excitação de átomos em um material e esses saem de seu estado fundamental e passam ao estado eletronicamente excitado, emitindo luz e/ou calor no seu decaimento.

A teoria da dualidade partícula/onda formulada por de Broglie trata a energia eletromagnética como quanta de energia que se movem através do espaço com movimento ondulatório e assim, a luz possui natureza ondulatória e corpuscular. A energia de um quantum de luz (fóton) pode ser definida como: $E = h\nu$, sendo h a constante de Planck cujo valor é $6,6 \times 10^{-27}$ erg.s e ν a frequência do fóton que corresponde a velocidade da radiação eletromagnética (c) dividida pelo seu comprimento de onda. A interação da energia eletromagnética com a matéria pode resultar em diferentes fenômenos que são alterações nas propriedades óticas de propagação da luz tais como reflexão e espalhamento ou absorção.

As moléculas possuem a energia total composta por energia eletrônica, energia vibracional e energia rotacional, em ordem decrescente de energia. Assim, dependendo do comprimento de onda que foi absorvido diferentes fenômenos podem se seguir. A absorção de Raios-X e raios gama resultam na ejeção do elétron (efeito fotoelétrico), enquanto que a absorção de fótons do espectro ultravioleta e visível resulta na transição eletrônica, ou seja, um elétron é promovido do orbital molecular ocupado de mais baixa energia para (do Inglês, lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) para um orbital molecular não ocupado de mais alta energia (do Inglês, highest energy occupied molecular orbital, HOMO).

Para observar o fenômeno de absorção de luz é utilizada a técnica de espectroscopia UV-visível que é útil para quantificar e qualificar substâncias. Quando ocorre absorção de um fóton de luz infravermelha, a energia não é suficiente para promover uma transição eletrônica, mas promove vibrações moleculares específicas, conforme o comprimento de onda absorvido e que também é utilizada na identificação de substâncias por meio da técnica de espectroscopia com infravermelho (NICHOLAS J. TURRO, 1991; WARD, 2009).

Quando a transição eletrônica envolve inversão de spin, a molécula tem um tempo de vida relativamente mais longo no estado excitado e que pode durar de microsegundos a segundos. O decaimento radiativo do estado eletronicamente excitado resulta no estado triplete ou fenômeno de fosforescência.

Como o estado eletronicamente excitado triplete tem caráter bastante reativo a molécula nesse estado pode sofrer reações fotoquímicas. Em meio aerado, o estado eletronicamente excitado triplete de algumas moléculas pode ser prontamente desativado pela transferência da energia de excitação eletrônica para o oxigênio molecular e produzir o oxigênio singlete ou fenômeno de fluorescência, que é também altamente reativo em relação ao oxigênio molecular (NICHOLAS J. TURRO, 1991).

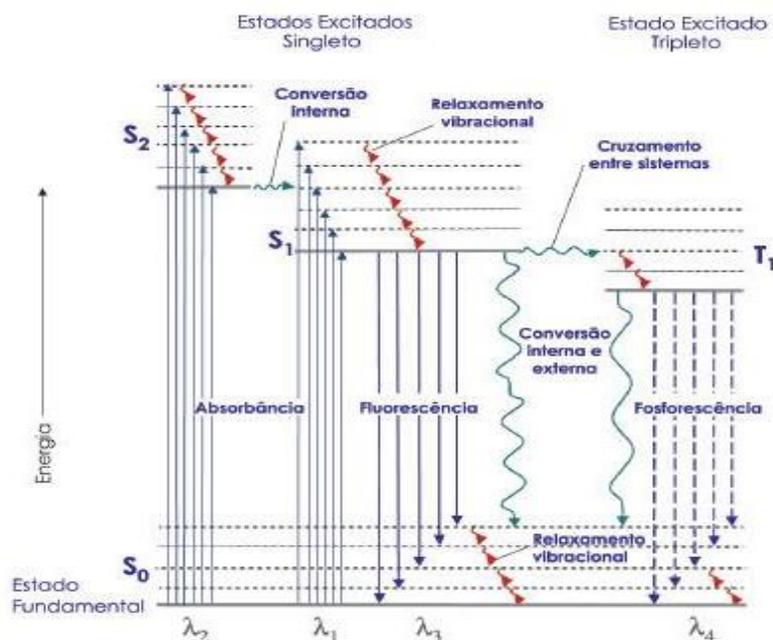


Figura 2. Diagrama de Jablonski resume os principais processos fotofísicos e fotoquímicos resultantes da interação da luz com a matéria após uma molécula absorver um fóton com energia da faixa ultravioleta ou visível. S₀ é o estado eletrônico fundamental, S₁ e T₁ são os estados singlete e tripleto de menor energia, respectivamente. S₂ é o segundo estado singlete excitado. As setas retas representam os processos envolvendo fótons e as setas onduladas as transições

Os fenômenos fotofísicos, entre eles a emissão de fluorescência, podem ser modulados por diferentes estratégias que serão consideradas abaixo.

O espectro de emissão e o rendimento quântico dos fluoróforos podem ser modulados de acordo com a estrutura molecular, presença de doadores ou puxadores de elétrons, constante dielétrica do meio. Mais recentemente, com o advento da Nanociência, a associação com nanoestruturas mostrou ser mais um caminho para a modulação dessas propriedades (BARRETO et al., 2019). As nanopartículas metálicas possuem propriedades de fluorescência próprias, que não serão consideradas aqui porque não é o foco do presente estudo. Os materiais na escala nano (1-100 nm) apresentam propriedades específicas devido às características de sua interface. O material nanométrico possui a maior parte ou parte significativa dos seus átomos localizados na superfície. Novas propriedades surgem na escala nanométrica devido à falta de simetria

na interface ou devido ao confinamento de elétrons. Particularmente, as nanopartículas metálicas, apresentam cores diferentes conforme o tamanho e forma das partículas. A cor das nanopartículas se deve à oscilação coletiva dos elétrons na banda de condução, conhecida como oscilação plasmônica da superfície. Essa oscilação se encontra na região visível do espectro eletromagnético e responde pela forte absorção de luz nessa região espectral (banda plasmônica). As propriedades óticas das nanopartículas metálicas mudam discretamente com o tamanho e agregação (4. TOMA, 2016) .

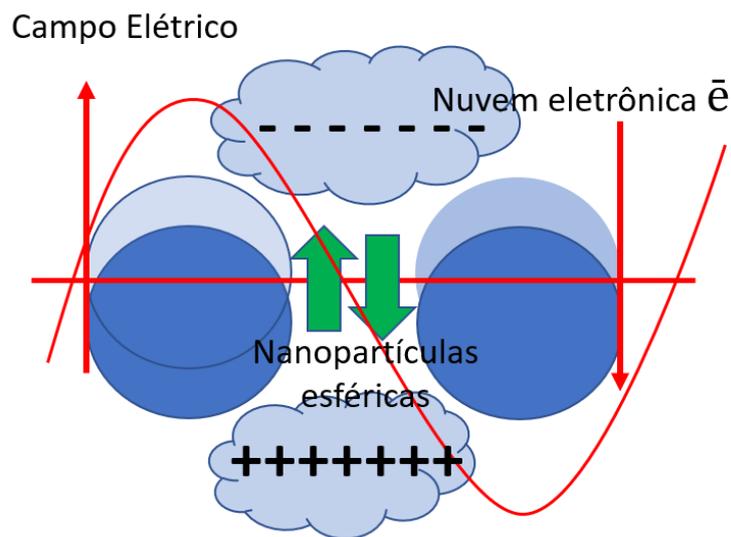


Figura 3. O fenômeno de ressonância plasmônica. Origem da ressonância plasmônica de superfície devido à interação coerente dos elétrons na banda de condução com a luz. Adaptado de aula da PUC, certificação digital 0821689.

As nanopartículas metálicas possuem aplicações baseadas nas suas propriedades óticas que são a absorção da banda plasmônica, o efeito SERS (do Inglês, surface enhanced resonance scattering) e a fluorescência das próprias nanopartículas e dos cromóforos a elas adsorvidos. A absorção da banda plasmônica é sensível a ligação de diferentes moléculas, ao pH, força iônica do meio e constante dielétrica de tal modo que pode ser usada para detecção de moléculas e variação do meio. Apresentam propriedades fluorescentes e também interferem na fluorescência dos cromóforos a elas adsorvidos, características essas que são o foco do presente estudo.

O efeito das nanopartículas metálicas sobre a fluorescência dos cromóforos depende da distância a que esse cromóforo está da superfície da nanopartícula. O efeito sobre a fluorescência dos cromóforos decorre do forte campo eletromagnético gerado na superfície das nanopartículas metálicas. Cromóforos situados muito próximos à superfície da nanopartícula metálica, ou seja, a cerca de 5 nm, tem sua fluorescência suprimida e aqueles situados a uma distância de cerca de 10 nm tem sua fluorescência aumentada até 100 vezes. Os cromóforos situados a cerca de 5 nm interagem eletronicamente com a superfície da nanopartículas metálica para doar elétrons excitados para o metal. À medida que a distância aumenta o campo eletromagnético ainda é forte o suficiente para aumentar a probabilidade de fluorescência, mas a distância já não possibilita a doação de elétrons para o metal. Para o futuro, se faz necessário um melhor estudo e caracterização desses fenômenos para o desenvolvimento de sistemas autônomos e dinâmicos de transmissão de informação (RODUNER, 2006).

4. Luminescência

A Luminescência é a emissão de luz que certos materiais ou organismos emitem quando em temperatura relativamente fria. A emissão da luminescência ocorre quando há a absorção de energia como ultravioleta, raios X, reações químicas, mas não há aquecimento, por esse motivo é chamada de luz fria.

Há vários tipos de luminescência de acordo com a fonte doadora de energia. Aqui trataremos da Bioluminescência, que é a habilidade de emitir fótons via processos químicos (SIRAJ et al., 2016).

4.1. Bioluminescência

A bioluminescência é a emissão de luz fria visível, gerada por reações químicas, catalisadas enzimaticamente, pelos organismos vivos. Ocorre em vários organismos como fungos, algas, cefalópodes, peixes etc. No ambiente terrestre ocorre principalmente nos insetos. Serve principalmente para fins de comunicação biológica, sendo, portanto, uma das assinaturas da vida e, por essa razão, serve como um excelente bioindicador do nível molecular para o nível ambiental, e como um excelente reagente bioanalítico, marcador celular e de expressão gênica (ZIMMER, 2009).

Em vagalumes, as luciferases, enzimas, catalisam a oxigenação da luciferina usando $Mg_2 + ATP$ para produzir o estado excitado de oxiluciferina que emite luz. Essas luciferases serviram como modelos de estudo de estrutura e função, especialmente entre a estrutura e os espectros de bioluminescência, resultando em importantes descobertas científicas sobre como a estrutura dessas enzimas determina as cores da bioluminescência. Além do interesse científico, essa informação permitiu o desenvolvimento de novas luciferases com propriedades modificadas para fins bioanalíticos. Assim, as luciferases têm sido empregadas para catalisar reações em triagem de alto rendimento, particularmente nos ensaios baseados em bioluminescência.

Na equação geral da bioluminescência, a luciferina é oxidada por oxigênio gerando o produto, oxiluciferina, no estado eletronicamente excitado. Este se desativa por emissão de luz de cores que variam do azul ao vermelho. Na Figura 4, à esquerda, vemos o diagrama de Jablonski, ilustrando a excitação eletrônica de moléculas por absorção de fótons, seguida de emissão

de luz fluorescente (do estado singlete ou S1 ou fosforescente, do estado Triplete ou T1 de diversas cores, de acordo com a energia de excitação eletrônica.

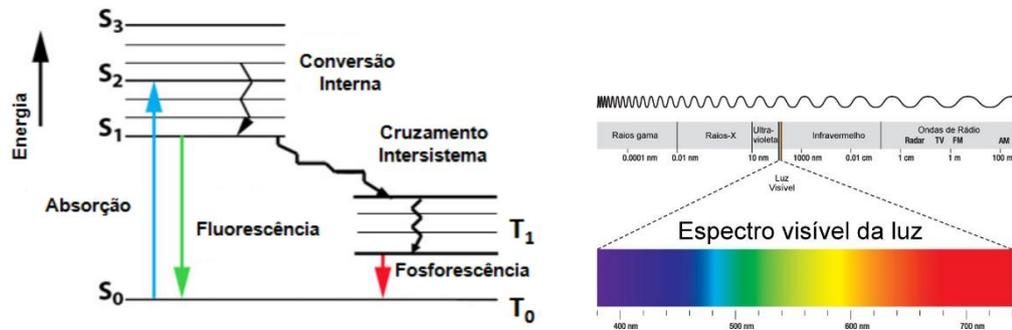


Figura 4: Diagrama de Jablonski simplificado e Espectro eletromagnético. Ilustração adaptada de Peter Hermes Furian.

Atualmente, as luciferases, são estudadas e aplicadas como marcadores bioluminescentes de expressão gênica em células de mamíferos, em estudos de ritmo circadiano, prospecção de drogas anticancerígenas e antibióticos, entre uma vasta gama de outras aplicações

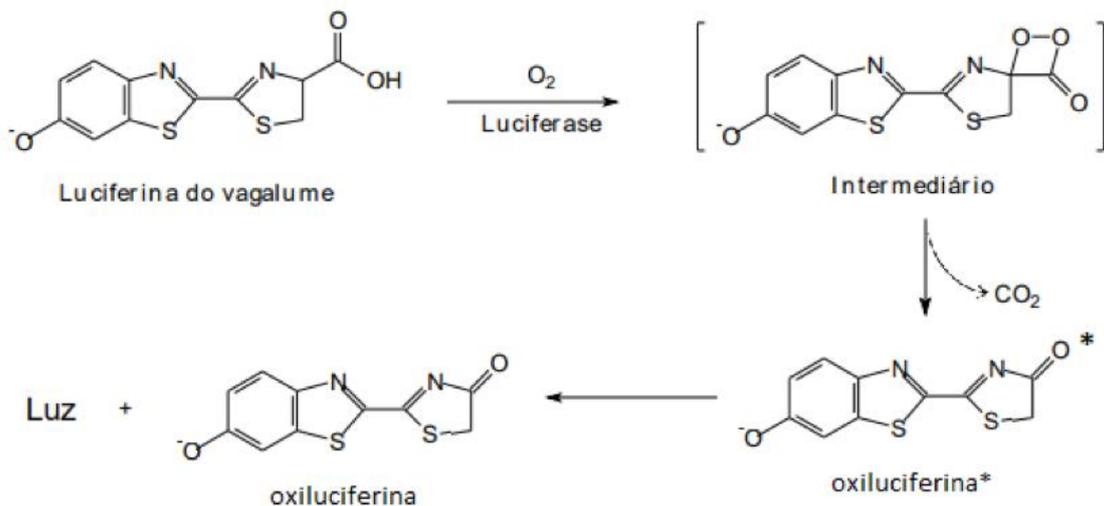


Figura 5. Representação da Equação geral da bioluminescência.

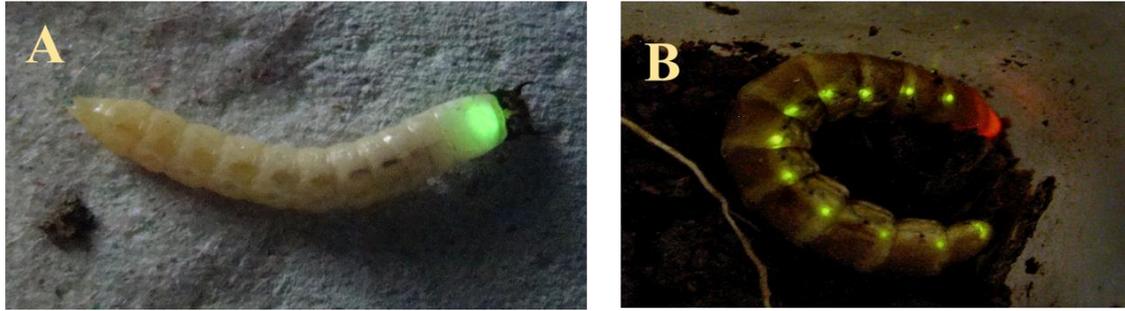


Figura 6. Larvas de coleópteros (Lampyridae) bioluminescentes a partir dos quais das luciferases recombinantes foram clonadas.

(A) *Pyrearinus termitilluminans*;

(B) *Phrixothrix hirtus*.

O uso de enzimas tem sido alvo de crescente interesse para a síntese e funcionalização de nanopartículas metálicas, portanto a luciferase foi considerada para esse estudo. Um fato importante a ser mencionado é que esses organismos, figura 6, são parte da fauna brasileira e estudados pela primeira vez neste projeto em colaboração com a UFSCAR.

5.OBJETIVOS

5.1.Objetivo Geral

Investigar e caracterizar os efeitos da associação de nanopartículas de ouro esféricas produzidas com o sistema tampão HEPES-Fosfato e HAuCl_4 , sobre a fotofísica de diferentes fluoróforos e enzimas bioluminescentes com potencial de aplicação como marcadores celulares e sistema nanotecnológicos.

5.1.1. Objetivos específicos

Determinar os efeitos da associação com nanopartículas de ouro sobre a fluorescência de NBD PS conforme a topologia do fluoróforo na bicamada lipídica.

Caracterizar a associação de lipídios com marcador fluorescente, tais como 18:1 NBD PS; ao complexo enzimático Luciferase-luciferina, assim como com nanopartículas de ouro esféricas revestidas com PEG por meio de mudanças quantitativas e qualitativas nos respectivos espectros de fluorescência.

6.MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Materiais

Sal metálico de ouro (ácido tetracloroáurico trihidratado - $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Solução Tampão HEPES_Fosfato, PEG - poli (etileno glicol) ditiol 8000 Dalton, L-cisteína, cumarina-6, todos obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Lipídeos com marcador fluorescente: 18:1 NBD PS (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)), obtidos da Avanti Polar Lipids, INC. Complexo Luciferina/Luciferase purificada – em colaboração com Professor Dr. Viviani R.Vadim do Laboratório de Sistemas Bioluminescentes da UFSCAR Sorocaba.

6.2. Métodos

6.2.1. Síntese e caracterização de nanopartículas.

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas com solução tampão HEPES – Fosfato de sódio bibásico (30mM, pH 10) acrescido de solução de sal de ouro HAuCl_4 (0,39 mM) e solução de PEG (1,6 mM) a temperatura ambiente (25°C).

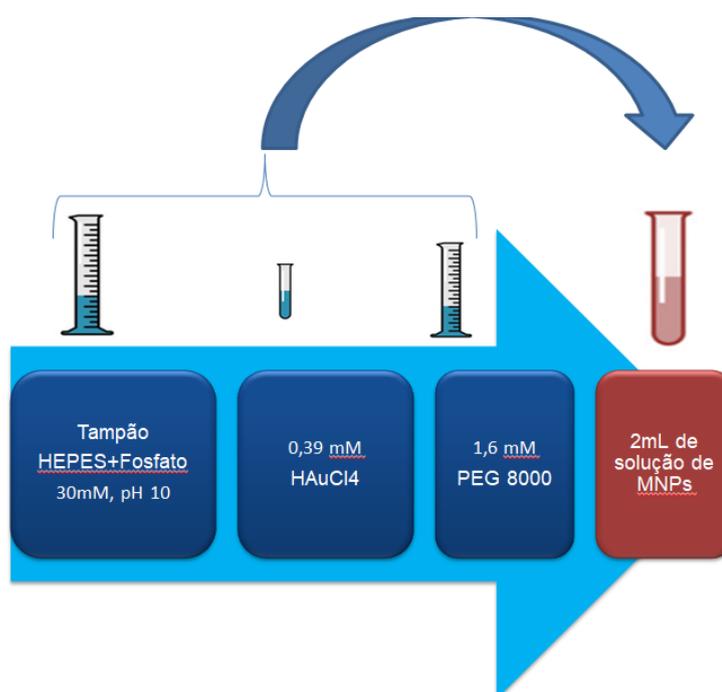


Figura 7. Esquema representativo da síntese de AuNPs em uma fase

6.2.2. Espectroscopia UV-Vis.

Os espectros de absorção foram obtidos utilizando espectrofotômetro Thermo Fisher (Evolution 220), cubeta de quartzo de 1 cm, à temperatura ambiente. Essas medidas baseiam-se na absorção da radiação eletromagnética, nas regiões visível e ultravioleta do espectro. Mede-se a quantidade de luz absorvida pela amostra e relaciona-se a mesma com a concentração.

6.2.3. Espectroscopia de FTIR.

Essa é uma técnica de espectroscopia vibracional que fornece informações sobre a composição molecular, estrutural e interações moleculares em uma amostra. Soluções de enzimas foram analisadas por essa técnica e os resultados interpretados qualitativamente considerando as bandas de absorção típicas de proteína para considerações sobre mudanças na sua estrutura secundária decorrentes da associação com nanopartículas.

Nesse estudo foi utilizado o Espectrômetro Spectrum Two FTIR equipado com o *Universal ATR sampling accessory* (PerkinElmer) com cristal de diamante, varredura de 700 a 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans. Para a realização da leitura espectral de cada amostra foi depositado sobre o cristal de diamante 10 μL da solução a ser analisada, em seguida a amostra era rodeada com esferas de sílica e esse conjunto era coberto com uma tampa de tubo Falcon até que a amostra fosse desidratada e ocorresse a formação de um filme (aproximadamente 20 minutos).

6.2.4. Espectroscopia de Fluorescência.

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos utilizando espectrofotômetro de fluorescência, Varian – Cary Eclipse com cubeta de quartzo de 10mm, à temperatura ambiente. Foram utilizadas nanopartículas de ouro funcionalizadas com o fluoróforo: 18:1 NBD PS (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)) a 0,53 mM; diluído em tampão HEPES-fosfato. O mesmo tampão foi usado como controle em comparação com as soluções de nanopartículas associada ao respectivo fluoróforo para verificação da variação da fluorescência.

6.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV analisa a superfície da amostra por meio de um feixe de elétrons que interagindo com a amostra produz elétrons e fótons coletados por detectores e convertidos em sinal de vídeo, assim se forma a imagem. Para nossas imagens foi utilizada uma amostra em solução das nanopartículas de ouro, previamente lavadas com uma solução de L-cisteína e colocadas em pequenas placas silício e desidratadas no banho seco, restando apenas as

nanopartículas, o equipamento utilizado foi um FESEM JMS-6701F, JEOL, da central multiusuário da UFABC.

6.2.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de MET foram feitas por colaboradores do CNPEM – LNNano em microscópio eletrônico de transmissão modelo TALOS F200C (Thermo Fischer Scientific, USA), operando em modo convencional (temperatura ambiente) a 200kV; o microscópio é equipado com uma câmera Ceta 16M CMOS 4k x 4k (Thermo Fischer Scientific, USA) para a aquisição digital de imagens. Preparo das amostras: As amostras foram preparadas em grades de cobre – Ultra-thin Carbon on Lacey Carbon 400 mesh copper grid (TedPella, USA), as quais foram submetidas ao procedimento de Glow Discharge em um equipamento easiGlow (Pelco, USA), com os seguintes parâmetros: corrente de 15 mA; carga negativa; 25 segundos de descarga. Aplicou-se 3 μ L de amostra, como recebida, na grade e após 1 minuto removeu-se o excesso da amostra com papel filtro convencional.

6.2.7. Expressão e purificação da luciferase.

Plasmídeo pCold transportando os cDNAs para luciferases de *P.hirtus* railroadworm e *Pyrearinus termitilluminans*, foram usadas para transformar *E. coli* BL21. As luciferases recombinantes foram expressas por indução com IPTG e cromatografia de afinidade em agarose com Nickel bi-purificada. A concentração da solução estoque para fazer a síntese de nanopartículas foi 0,23 mg / mL ou 3,77 μ M para ambas as luciferases.

6.2.8. Atividade Luminescente.

A intensidade de luminescência foi medida usando um luminômetro AB2200 (ATTO, Tokyo) em contagens por segundo (cps). A bioluminescência foi fotografada usando uma câmera CCD Light Capture (ATTO, Tóquio).

6.2.9 Espectros de bioluminescência.

Os espectros de bioluminescência *in vitro* foram medidos por espectrometria utilizando equipamento Lumi Fi Spectro Capture AB-1850 (ATTO, Tóquio).

Esse ensaio de atividade foi realizado com volume final de 100 μL , sendo:

85 μL de solução de Tris-HCl a 0,10 M, pH 8,0; 5 μL de enzima purificada Py a 1,1 μM e RE a 1,13 μM , 5 μL de D-luciferina a 10 mM, e 5 μL de ATP a 40 mM e MgSO_4 a 80 mM.⁵

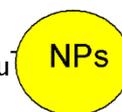
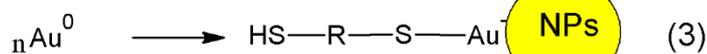
As análises 6.2.7 a 6.2.9 foram realizadas por nossos colaboradores na UFSCAR (Dr. Viviani Vadim e alunos)

7.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho trata da síntese de nanopartículas metálicas com o emprego de PEG(SH)₂, poli (etileno glicol) ditiol 8000 como agente redutor e de recobrimento para estudos de luminescência e fluorescência. É conhecido que a associação com nanopartículas metálicas pode alterar a atividade das enzimas e no presente trabalho investigamos como a associação de nanopartículas de ouro (AuNPs) com diferentes recobrimentos e híbridas com magnetita poderia afetar a bioluminescência relacionada com a atividade das luciferases. Também foram testados a associação de AuNPs recobertas pelo polímero (PEG(SH)₂AuNPs) com lipídios fluorescentes com objetivo de estudar a modulação da fluorescência.

7.1. Caracterização das Nanopartículas

As AuNPs foram sintetizadas com uso de poli (etileno glicol) ditiol 8000 (PEG(SH)₂) como agente redutor dos íons ouro, no processo de síntese. Em uma síntese padrão, as AuNPs formadas ficaram recobertas por PEG(SH)₂. O PEG(SH)₂ foi escolhido porque os grupos tióis são bons agentes redutores para os íons ouro e possuem afinidade pela superfície das nanopartículas desse metal no processo:



As AuNPs sintetizadas com uso de PEG(SH)₂ como agente redutor e estabilizante foram caracterizadas, em solução por espectroscopia UV-visível e, após secagem da amostra em placa de silício, foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. A espectroscopia UV-visível, de acordo com a Lei de Mie (LOCKWOOD, 2016), traz a contribuição de absorvância e espalhamento (Figura 8,

linha verde). A presença de banda plasmônica com pico em 532 nm é consistente com a formação das AuNPs. Por meio da imagem de MEV é possível observar estruturas de cerca de 15 nm de diâmetro que se organizam como agregados supramoleculares recobertos por PEG(SH)₂ estabilizado por meio de ligação tiol-ouro. Portanto, a imagem de MEV corroborou a formação das AuNPs.

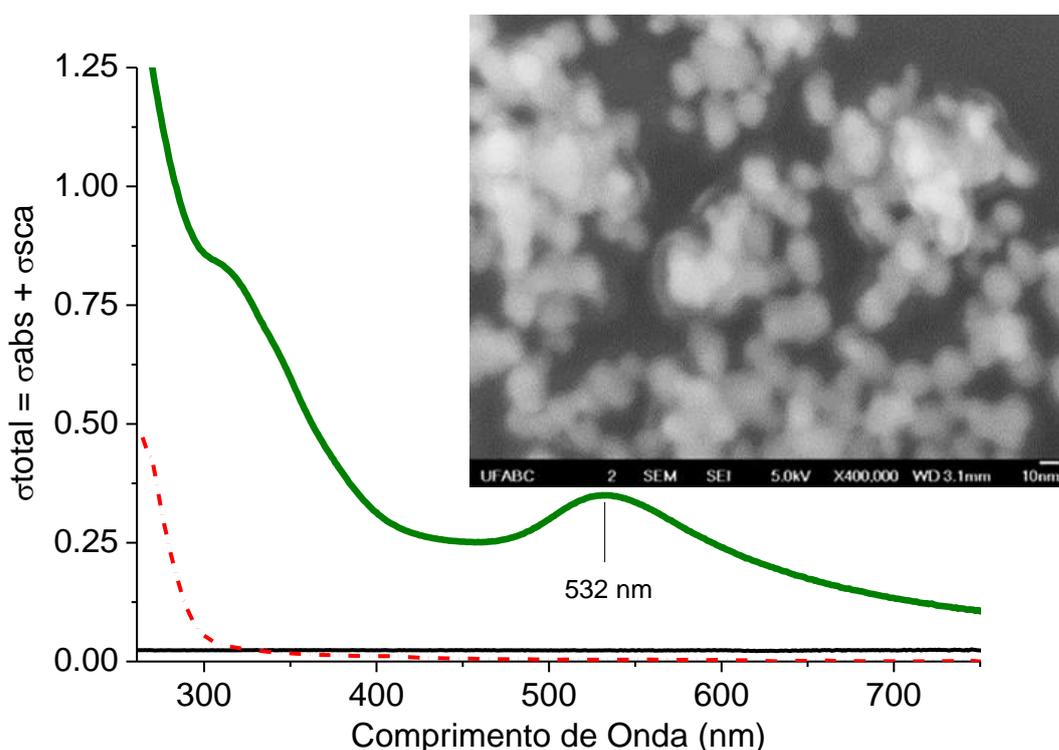


Figura 8. Espectro UV-visível da solução de (PEG(SH)₂)AuNPs (linha grossa verde) em comparação com o tampão HEPES usado na síntese (linha fina preta) e a solução de PEG(SH)₂ (linha pontilhada vermelha) usados na síntese.

O recobrimento pelo polímero pode ser substituído por L-cisteína o que leva à desagregação das AuNPs. Para tal as AuNPs devem ser lavadas com solução aquosa de L-cisteína. A interação de nanopartículas de ouro (AuNPs) com cisteína e seus derivados é a base de várias tecnologias e, para elas, o processo mais importante é a agregação ou antiagregação (ACRES et al., 2014).

A figura 10 mostra a imagem de MEV da amostra tratada com cisteína e o correspondente histograma de distribuição de tamanho o qual mostra que as partículas têm diâmetro médio de aproximadamente 16 nm

e, nesse caso não é observado mais a presença de agregados revestidos por uma capa do polímero e foi obtida uma melhor dispersão da amostra. Nesse experimento foram feitas lavagens com solução de L-cisteína (1,6 mM) de tal modo que esse aminoácido pudesse deslocar o grupo tiol do polímero da superfície do ouro e as AuNPs passassem a ficar revestidas com L-cisteína e assim, desagregadas.

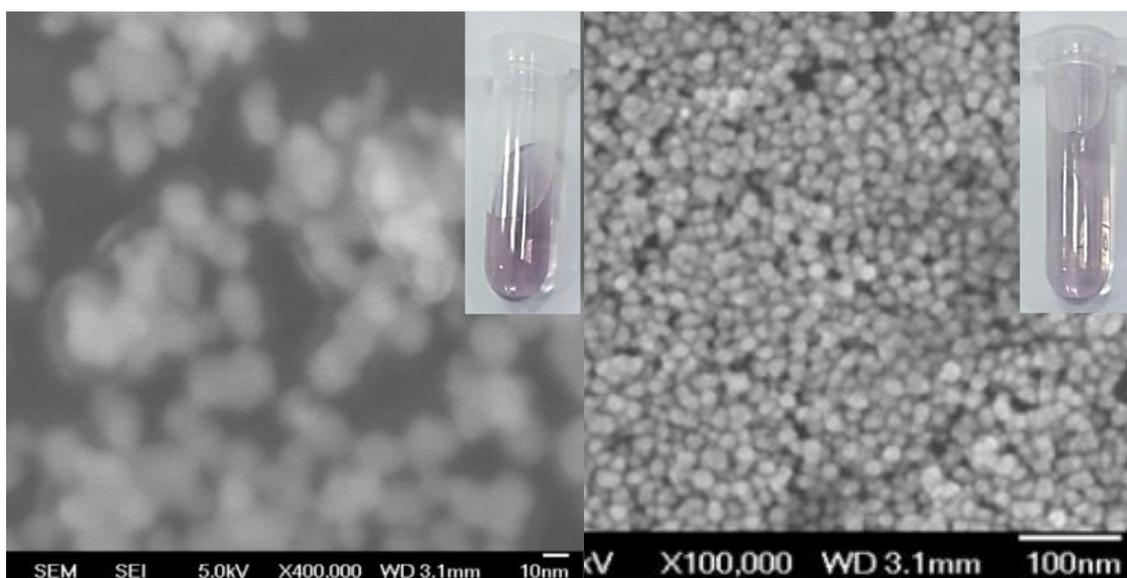


Figura 9 . Imagens de microscopia eletrônica de Varredura - MEV: A imagem da esquerda mostra a estrutura das NPs isotrópicas estabilizada pela síntese e revestida com PEG ditíol 8000 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + \text{HS} \text{O} \text{n} \text{SH}$). A imagem da direita mostra a estrutura das NPs revestidas com PEG 8000 e lavadas com solução de L-cisteína e água Milli-Q

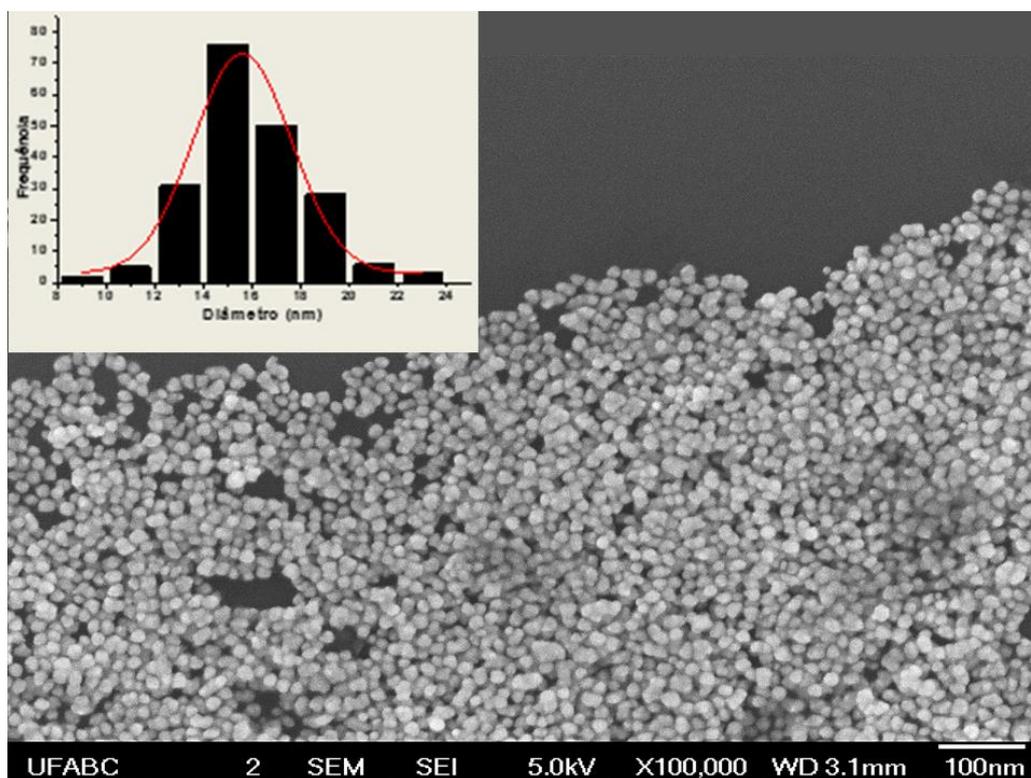


Figura 10. Histograma das AuNPs tratadas com L-cisteína. AuNPs são esféricas monodispersas com diâmetro de $15,57 \pm 2,7$ nm.

7.2. Fluorescência

Existe um interesse crescente em explorar a capacidade de sintetizar nanopartículas de ouro (AuNPs) mediadas por polímeros biocompatíveis como agentes redutores e de encapsulamento. A capacidade de redução e a afinidade de ligação são fornecidas por $-SH$ na estrutura. Poli (etileno glicol) ditiol [PEG (SH) 2] foi usado para a síntese de AuNPs com diâmetro médio de $15,5 \pm 2$ nm. PEG (SH) 2AuNPs foram associados com derivados de fosfatidilserina: 18: 1 NBD PS, com o fluoróforo localizado respectivamente no grupo principal.

Inicialmente testamos como essas NPs de ouro afetam sistemas fluorescentes. Para tanto, utilizamos um derivado lipídico (fosfatidilserina) do NBD (*N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl): o lipídio 18:1 NBD PS (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl).

A figura 12 mostra que o NBD18:1 tem o fluoróforo localizado na cabeça do fosfolipídio. O efeito das PEG(SH)₂AuNPs sobre esse lipídio fluorescente nos dá indicativos da topologia deste na superfície dessas NPs (PIFFOUX et al., 2018; MILIARA et al., 2019).

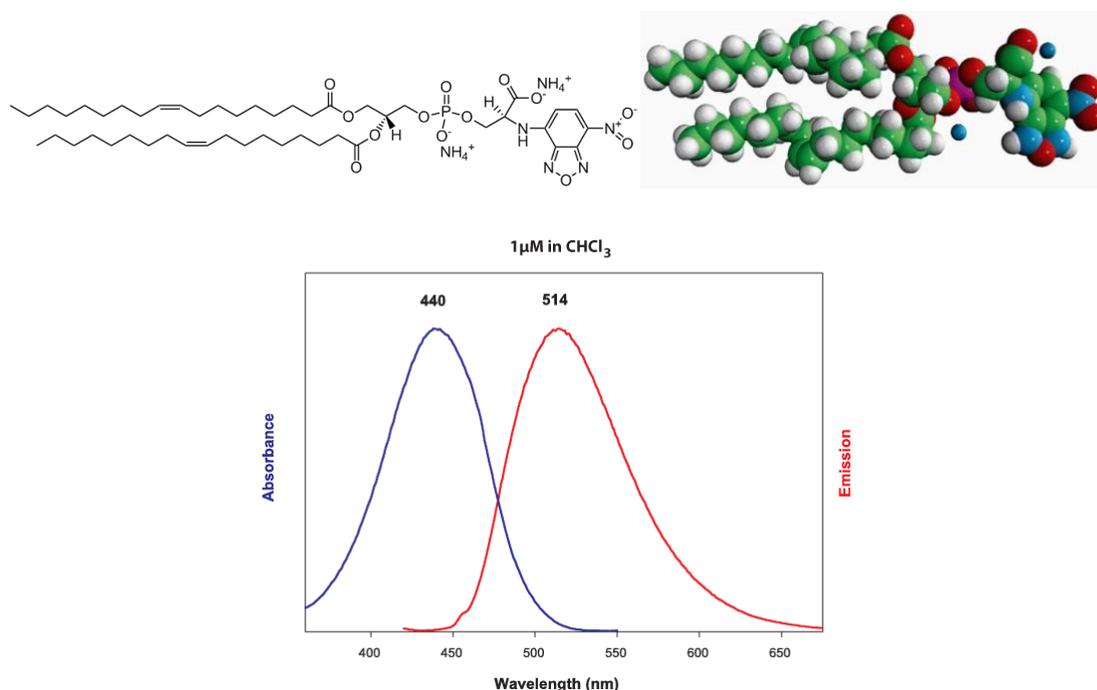


Figura 11. NBD PS 18:1 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) – Superior, da esquerda para a direita, representação da estrutura molecular, e estrutura 3D, inferior espectros de absorção e emissão respectivamente. Fonte Avanti Polar Lipids.

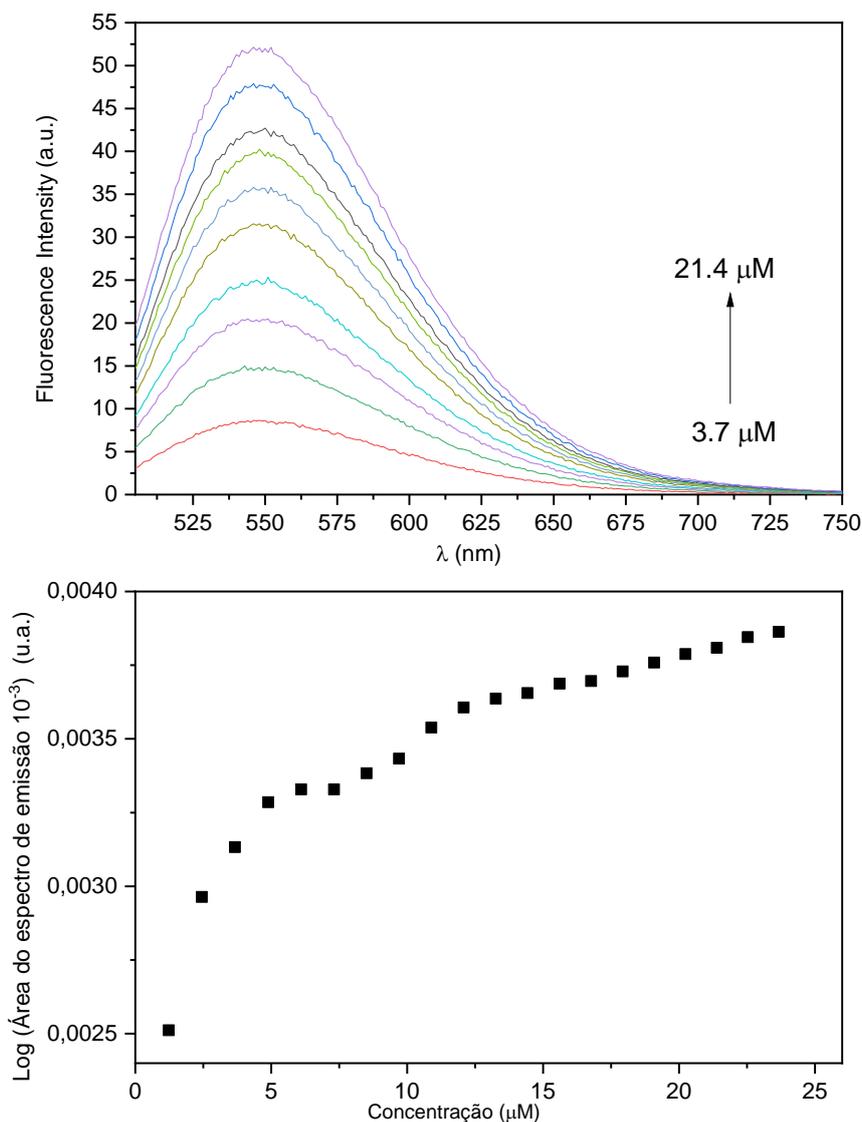


Figura 12. Espectros de fluorescência e curva de titulação do fluoróforo NBD PS 18:01 em tampão

Pela observação do espectro na figura 12, podemos inferir que à medida em que a concentração de NBD aumenta, sua estrutura supramolecular se rearranja em 3 conformações diferentes. A primeira inclinação refere-se a forma monomérica que rapidamente se rearranja numa espécie de agregado micelar, indicado pela região onde a inclinação da curva é mais acentuada, por este fato o rearranjo deve acontecer rapidamente. Essa forma micelar deve, provavelmente, coexistir com a forma monomérica (essa última, em pouca quantidade).

Nas concentrações mais altas pode ocorrer a formação de agregados micelares maiores como se fossem “micelas multilamelares”, coexistindo com os agregados micelares menores e as formas monoméricas (as duas últimas em menores quantidades). No entanto, como as últimas concentrações são muito altas e não temos aqui uma correção pela absorção, é provável que só existam duas populações conformacionais.

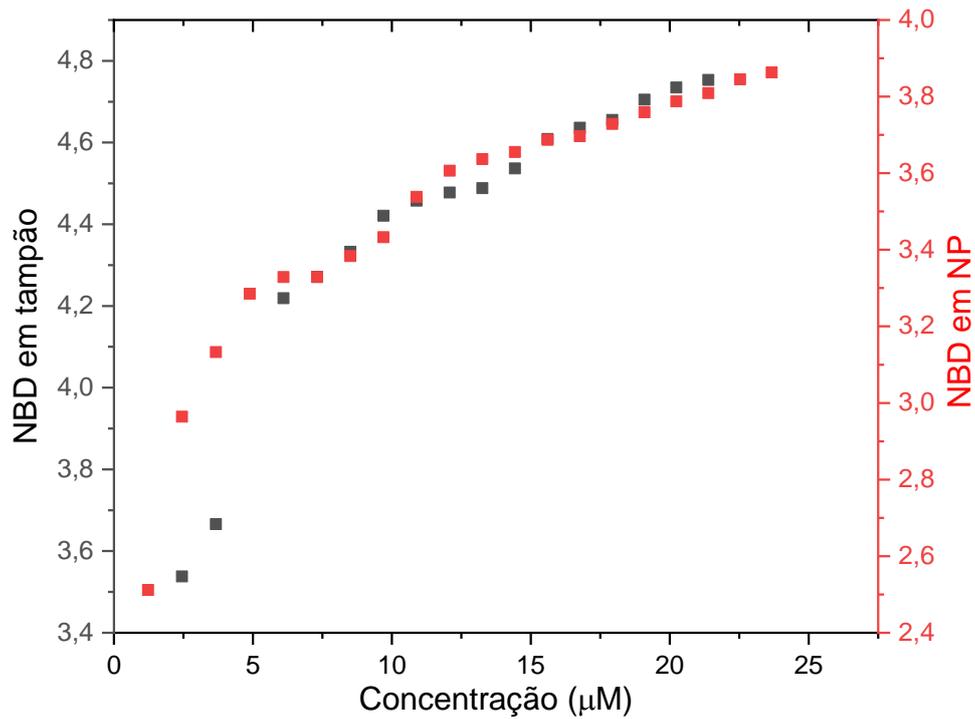


Figura 13. Espectro de fluorescência e curva de titulação do NBD em tampão versus em NBD

Estes resultados sugerem que as microvizinhança das cabeças polares sofrem as mesmas mudanças seja em tampão seja na solução de nanopartículas. Em outras palavras, reforça a ideia de que a interação NBD NP seja pelas caudas e não pelas cabeças.

7.3. Bioluminescência

A associação com nanopartículas metálicas pode alterar a atividade das enzimas e no presente trabalho investigamos como a associação com nanopartículas de ouro (AuNPs) com diferentes recobrimentos poderia afetar a atividade das luciferases. As AuNPs foram todas sintetizadas com uso de poli(etileno glicol) ditiol 8000 (PEG(SH)₂) como agente redutor dos íons ouro, no processo de síntese. Em uma síntese padrão, as AuNPs formadas ficaram recobertas por PEG(SH)₂. O PEG(SH)₂ foi escolhido porque os grupos tióis são bons agentes redutores para os íons ouro e possuem afinidade pela superfície das nanopartículas desse metal no processo

Conforme figura 14, para controle dos resultados da interação das nanopartículas com as enzimas, no início do experimento foram realizados espectros de bioluminescência. Conforme a figura abaixo, as enzimas estavam ativas em sua banda regular de emissão, já que não houve desvio significativo na banda de cada uma delas.

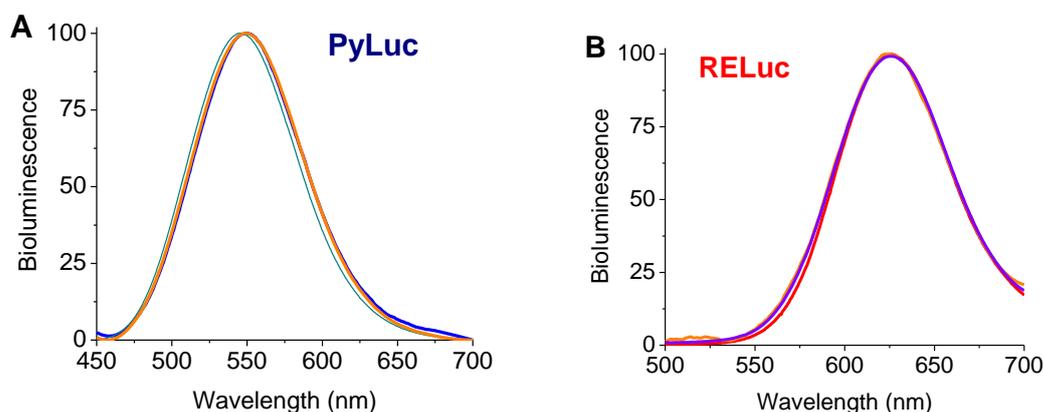


Figura 14. Espectros de Bioluminescência das enzimas RE e PY. A: Em azul a Enzima Py em 546nm - *Phrixothix hirtus*; em preto Nanopartículas de H_{AuCl}4 com Enzima Py; em vermelho Nanopartículas de AgNO₃ com Enzima Py. B: Em azul a Enzima RE, em 623nm - *Phrixothix hirtus*; em preto Nanopartículas de H_{AuCl}4 com Enzima RE; em vermelho Nanopartículas de AgNO₃ com Enzima RE.

Uma terceira variante das AuNPs foi uma tentativa de hibridização com magnetita (Fe₃O₄) nanoparticulada. Nesse caso, uma alíquota de suspensão aquosa de magnetita previamente sintetizada por método convencional como previamente descrito foram adicionadas a uma solução de PEG(SH)₂, seguida por adição de sal de ouro. A figura 15 mostra as fotos das suspensões de PEG(SH)₂AuNPs, AuNPs recobertas por cisteína, PEG(SH)₂AuNP@Fe₃O₄ e AuNP@Fe₃O₄ tratadas com cisteína como inserto dos espectros comparativos de PEG(SH)₂AuNPs PEG(SH)₂AuNP@Fe₃O₄. Nesse último está evidente a contribuição da magnetita na região de 400 nm do espectro. A lavagem com solução de cisteína promove diminuição da turbidez.

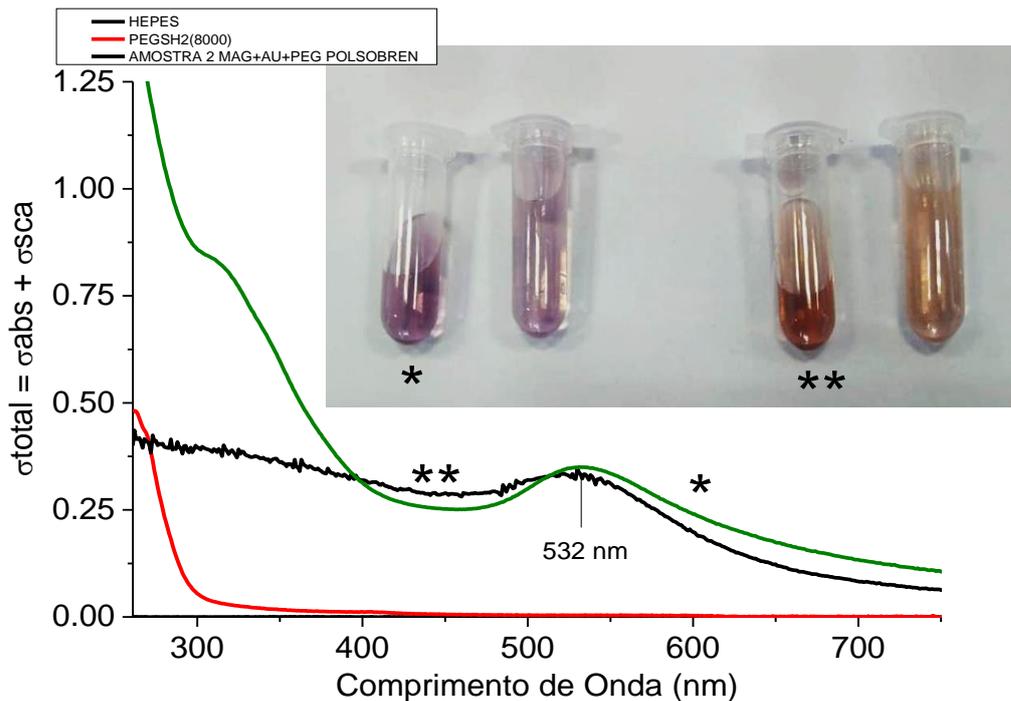


Figura 15. Espectro UV-visível da suspensão coloidal de (PEG(SH)₂AuNPs) (linha verde, um asterisco) em comparação com a suspensão coloidal de PEG(SH)₂AuNP@Fe₃O₄ (linha preta, dois asteriscos). As fotos das suspensões correspondentes estão assinaladas com um e dois asteriscos.

Para testar o efeito das nanoestruturas na atividade das luciferases, caracterizamos a ligação da enzima e sua estrutura por FTIR/ATR. Em uma primeira fase experimental, soluções tamponadas das enzimas luciferase do tipo *Pyrearinus termitilluminans* (PyLuc) e *Phrixothrix hirtus* (RELuc) foram adicionadas às suspensões de nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) sintetizadas com PEG(SH)₂ por meio do protocolo de um etapa já definido e a funcionalização foi analisada por FTIR conforme figura 16 (A,B). Os resultados foram interpretados qualitativamente considerando as bandas de absorção típicas de proteína para verificação das mudanças moleculares e/ou estruturais da enzima luciferase e das nanopartículas metálicas sintetizadas com PEG(SH)₂.

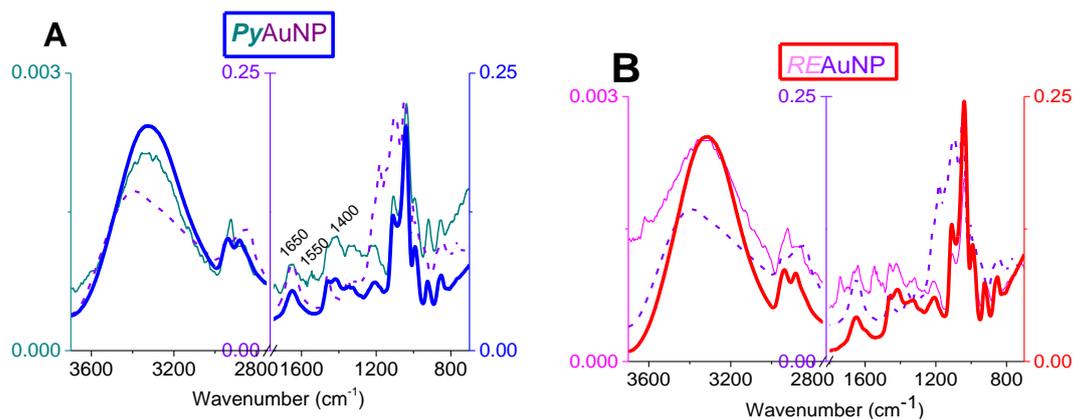


Figura 16. Espectros FTIR de soluções tamponadas de luciferase e de soluções coloidais de nanopartículas metálicas (Au e Ag) sintetizadas com o emprego de PEG(SH)₂, livres e associadas às enzimas. A - PyLuc (linha fina ciano escuro), AuNPs sintetizadas com PEG(SH)₂ (linha pontilhada violeta) e PEG(SH)₂AuNPs associados a PyLuc (linha espessa azul). B - RELuc (linha rosa), AuNPs sintetizadas com PEG(SH)₂ (linha pontilhada violeta) e PEG(SH)₂AuNPs associadas a RELuc (linha vermelha). Cada espectro sobreposto ao outro foi plotado em uma escala diferente na ordenada (y), portanto as intensidades não são comparativas. O eixo y correspondente a cada gráfico está na mesma cor da linha do gráfico.

A espectroscopia de absorção no infravermelho é um dos métodos clássicos para determinação da estrutura de pequenas moléculas devido a sua sensibilidade à composição química e arquitetura das moléculas. Assim, o FTIR representa uma ferramenta valiosa para a investigação de estrutura proteica, do mecanismo molecular de reações de proteína e do enovelamento, desnaturação e outras alterações conformacionais. As informações do espectro infravermelho podem ser exploradas mesmo para sistemas biológicos que são maiores que as proteínas (BARTH, 2007), tais como as estruturas supramoleculares formadas pela associação de nanoestruturas metálicas, PEG(SH)₂ e enzimas. Nesse estudo foi realizada a técnica de ATR-FTIR (Reflexão Total Atenuada) que realiza a análise somente da camada superficial da amostra (GLASSFORD; BYRNE; KAZARIAN, 2013).

A Figura 19 representa os espectros de ATR-FTIR obtidos das soluções tamponadas da enzima luciferase PyLuc e RELuc e das soluções coloidais de AuNPs sintetizadas com PEG(SH)₂ livres ou associadas a luciferases. Nos espectros das enzimas livres e associadas às NPs podem ser observadas,

bandas de absorção no infravermelho localizadas entre 1700 cm^{-1} e 800 cm^{-1} , relativas às vibrações dos grupos funcionais específicos de proteínas.

Nos espectros referentes às soluções de enzimas livre é possível identificar as bandas de absorção compreendida entre 1700 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} relativas as bandas da Amida I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) amida II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) e Amida III ($1400 - 1200\text{ cm}^{-1}$). Nos espectros de PEG (SH)₂MNPs associado às enzimas fica evidente a banda em 1400 cm^{-1} que não existia na solução coloidal das AuNPs o que indica a ligação da enzima à nanoestrutura considerando que a solução foi centrifugada e lavada por cinco vezes antes da análise. Esse processo de limpeza tem por objetivo remover as moléculas de enzima e de PEG(SH)₂ livres, deixando na solução a ser analisada somente a estrutura supramolecular formada pela associação.

Todas as formas produzidas de AuNPs foram testadas quanto aos efeitos na atividade das luciferases de *Phrixothrix hirtus* (RELuc) e *Pyrearinus termitilluminans* (PyLuc). Um ensaio típico de atividade em volume final de $100\text{ }\mu\text{L}$ é feito com $85\text{ }\mu\text{L}$ de tampão TRIS-HCl $0,1\text{M}$, pH 8, $5\text{ }\mu\text{L}$ das luciferases *Phrixothrix hirtus* (RELuc) na concentração de $0,056\text{ }\mu\text{M}$ e *Pyrearinus termitilluminans* (PyLuc) na concentração de $0,055\text{ }\mu\text{M}$ associada às diferentes AuNPs, $5\text{ }\mu\text{L}$ de LH2 (luciferina) na concentração de $10\text{ }\mu\text{M}$ e $5\text{ }\mu\text{L}$ de Mg^{2+} ATP na concentração de 80 e 40 mM , respectivamente. Quando indicado, a solução foi deixada em incubação por 2 horas, antes da adição de algum dos reagentes não adicionado. Após incubação, foram realizadas 4 medidas, 1 a cada 2 horas e mais 2 medidas overnight, sendo uma após 24 h e outra após 48 h. Para esses ensaios utilizamos a condição controle sem NPs (1), somente PEG (2), PEG(SH)₂AuNPs (3), AuNPs recobertas com cisteína, PEG(SH)₂AuNP@Fe₃O₄ e AuNP@Fe₃O₄ recobertas por cisteína.

A Figura 17 A, B e C mostra a luminescência do sistema luciferina/luciferase nas diferentes condições acima (1-6) e a manutenção da atividade da luciferase ao longo do tempo nessas diferentes condições. Em A à esquerda temos a foto para Py e à direita para a atividade de Re. Em B e C, as fotos de cima são para Py com menor e maior tempo de exposição e as de baixo para Re também com menor e maior tempo de exposição.

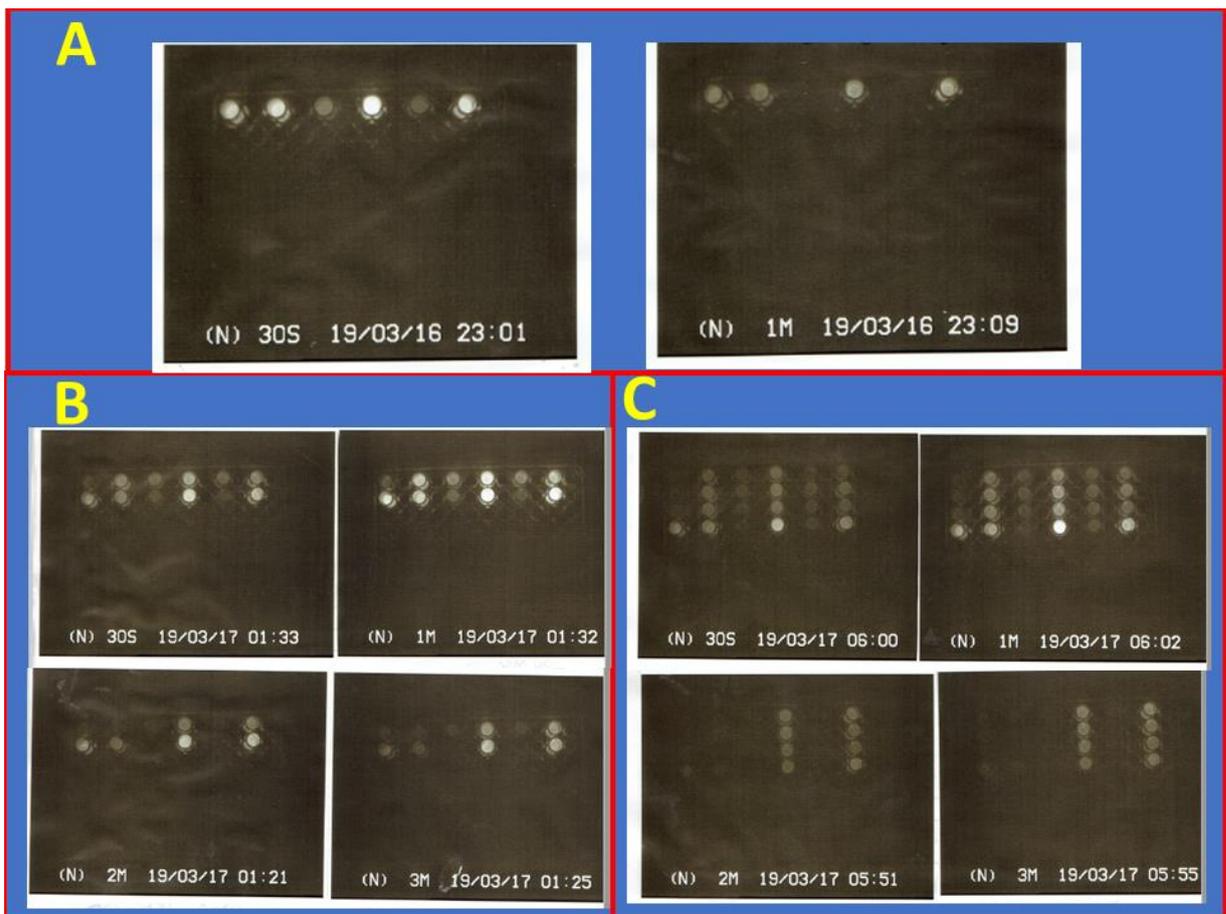


Figura 17. A, B e C correspondem a luminescência do sistema luciferina/luciferase nas condições acima (1-6) referidas no texto e alinhadas respectivamente nas seis colunas da esquerda para a direita. As linhas que segue uma abaixo da outra, são as medidas realizadas após ~2 h, 4 h, 5h e 7h de incubação. Em A) à esquerda temos a foto para Py e à direita para a atividade de Re. Em B) e C), as fotos de cima são para Py com menor e maior tempo de exposição e as de baixo para Re também com menor e maior tempo de exposição.

Os resultados apresentados na figura 17 mostram que a presença de cisteína impede a perda de atividade da Py e Re, provavelmente devido à ação antioxidante desse aminoácido. Para Py, o PEG sozinho prolongou mais a atividade da enzima do que nas NPs, mas nessa última condição, a atividade também foi prolongada. Para RE, a presença de cisteína foi a única condição que contribuiu significativamente para o prolongamento da atividade. As nanoestruturas não afetaram o pico máximo de emissão da oxiluciferina o que significa a emissão de luz do produto no sítio ativo da enzima. A intensidade de

luminescência do sistema em presença de NPs se mostrou sensível às condições que propiciaram proteção ao envelhecimento da enzima.

CONCLUSÃO

A presente dissertação apresenta a caracterização de nanopartículas de ouro sintetizadas com tampão HEPES-fosfato e PEG ditiol 8000. Por meio de imagens de MEV, TEM e UV-VIS, observou-se estruturas de cerca de 15 nm de diâmetro que se organizam como agregados supramoleculares recobertos por PEG(SH)₂, assim como pela presença de banda plasmônica com pico em 532 nm, consistente com a formação de AuNPs.

Foi observado que as PEG (SH)₂AuNPs capturaram o PS dos agregados, levando a mudanças na emissão do NBD.

Quando funcionalizadas com as enzimas luciferases o aparecimento de bioluminescência se mostrou mais rápido do que para a enzima nativa. A ligação da enzima à nanoestrutura foi demonstrada por meio dos espectros de FTIR das PEG(SH)₂AuNPs associado às enzimas nos quais fica evidente a banda em 1400 cm⁻¹ que não existia na solução coloidal das nanopartículas. Os resultados sugerem que estas luciferases são estabilizadas quando associadas com as nanopartículas conjugadas com PEG ditiol 8000, e que a supressão de luminescência e/ou a inativação enzimática podem ser evitadas pelo encapsulamento prévio das MNPs por macromoléculas tais como polímeros.

No caso da enzima, há influência da topologia dessa estrutura, como no caso do NDB, pois a supressão depende da proximidade do fluoróforo na superfície da partícula. Desse fato decorre a importância do uso de nanopartículas para modular a bioluminescência e daí as várias possíveis aplicações. O que se observou com NBD, que não dependia de atividade enzimática, só dependia da fluorescência, corrobora os dados observados pela bioluminescência que depende da atividade enzimática. Apesar de não ter sido ainda comprovado, foi observada menor bioluminescência com a NP magnética o que pode indicar perda de atividade, porém um fator muito provável é a supressão. O Efeito plasmônico, a capacidade de aumentar ou diminuir a luminescência ou a fluorescência depende da proximidade entre moléculas na interface, há uma distância crítica, abaixo dessa ocorrerá a supressão, quando estiverem muito próximas. Até uma certa distância ele pode aumentar a

emissão de luz e a uma distância muito grande já não há efeito a ser mensurado.

Nas condições apresentadas, as nanopartículas conjugadas com PEG ditiol 8000 se mostraram eficientes para serem funcionalizadas com os fluoróforos propostos e possuem a vantagem da síntese em apenas uma etapa, em temperatura ambiente.

Para a partícula híbrida PEG(SH)₂AuNP@Fe₃O₄, observamos uma diminuição da bioluminescência que pode decorrer da perda de atividade da enzima e/ou supressão de luminescência, levando-se em conta a região espectral relacionada à banda de ressonância plasmônica dos materiais em nano escala. Considerando que a morfologia e topologia das nanopartículas podem aumentar ou diminuir os fenômenos de fluorescência e bioluminescência, na associação, um fator fundamental a ser considerado é a superfície nas 3 dimensões, como já mencionado na revisão da literatura.

Pela primeira vez, através deste estudo podemos verificar e inferir que as enzimas PyLuc e RELuc associadas a nanopartículas conjugadas com PEG ditiol 8000 e/ou L-Cisteína, têm o potencial para uma diversidade de aplicações nanotecnológicas, já que houve um aumento e estabilização da bioluminescência. Essas aplicações abrangem desde a detecção de poluentes como metais pesados em águas a análises clínicas, como por exemplo, na dosagem de metabólitos e enzimas que possam ser acoplados ao gasto ou produção de ATP.

Os resultados apresentados sugerem que a presença de cisteína estabiliza a bioluminescência, o que pode ser indicativo de que essa molécula impede a perda de atividade da Py e Re, provavelmente devido à ação antioxidante desse aminoácido. Para Py, o PEG sozinho prolongou mais a bioluminescência do que nas NPs, mas nessa última condição, a bioluminescência também foi prolongada. Para RE, a presença de cisteína foi a única condição que contribuiu significativamente para o prolongamento da bioluminescência. As nanoestruturas não afetaram o pico máximo de emissão da oxiluciferina o que significa a emissão de luz do produto no sítio ativo da enzima. A intensidade de luminescência do sistema em presença de NPs se mostrou sensível às condições que propiciaram proteção ao envelhecimento da enzima.

9. REFERÊNCIAS

ACRES, R. G. et al. Mechanisms of Aggregation of Cysteine Functionalized Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 19, p. 10481–10487, 15 maio 2014.

ALVAREZ, M. M. et al. Emerging Trends in Micro- and Nanoscale Technologies in Medicine: From Basic Discoveries to Translation. **ACS Nano**, v. 11, n. 6, p. 5195–5214, 27 jun. 2017.

AUSTIN, L. A. et al. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 7, p. 1391–1417, 4 jul. 2014.

BARRETO, G. R. et al. Magnetoliposomes as model for signal transmission. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 1, p. 181108, 31 jan. 2019.

DREADEN, E. C. et al. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 7, p. 2740–2779, 2012.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, n. 3, p. 209–217, 2006.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. do C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860–1870, 2009.

FILICE, M.; PALOMO, J. M. Cascade Reactions Catalyzed by Bionanostructures. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 5, p. 1588–1598, 2 maio 2014.

GLASSFORD, S. E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 12, p. 2849–2858, dez. 2013.

GRZYBOWSKI, B. A.; HUCK, W. T. S. The nanotechnology of life-inspired systems. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 7, p. 585–592, 6 jul. 2016.

LEVENTIS, P. A.; GRINSTEIN, S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. **Annual Review of Biophysics**, v. 39, n. 1, p. 407–427, abr. 2010.

LOCKWOOD, D. J. Rayleigh and Mie Scattering. In: **Encyclopedia of Color Science and Technology**. New York, NY: Springer New York, 2016. p. 1097–1107.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.

MILIARA, X. et al. Structural determinants of lipid specificity within Ups/PRELI lipid transfer proteins. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1130, 8 dez. 2019.

MUSCHIOL, J. et al. Cascade catalysis – strategies and challenges en route to preparative synthetic biology. **Chemical Communications**, v. 51, n. 27, p. 5798–5811, 2015.

NETTO-FERREIRA, J. C. Catalytic Reactions Employing the Plasmon Effect of Supported Metal Nanoparticles. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, 2015.

NICHOLAS J. TURRO. **Modern Molecular Photochemistry**. [s.l.] University Science Books, 1991.

PENNER, M. H. Basic Principles of Spectroscopy. In: [s.l: s.n.]p. 375–385.

PIFFOUX, M. et al. Modification of Extracellular Vesicles by Fusion with Liposomes for the Design of Personalized Biogenic Drug Delivery Systems. **ACS Nano**, v. 12, n. 7, p. 6830–6842, 24 jul. 2018.

RAMADE, J. et al. Nano-fried-eggs: Structural, optical, and magnetic characterization of physically prepared iron-silver nanoparticles. **Nano Research**, v. 11, n. 11, p. 6074–6085, 25 nov. 2018.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 7, p. 583, 2006.

SCHRÖFEL, A. et al. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – A review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4023–4042, out. 2014.

SIRAJ, N. et al. Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 170–202, 5 jan. 2016.

THANH, N. T. K.; MACLEAN, N.; MAHIDDINE, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7610–7630, 13 ago. 2014.

TOMA, H. E. **Nanotecnologia molecular - materiais e dispositivos**. [s.l.] Blucher, 2016.

WARD, R. by M. “Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds” Parts I & II. **Platinum Metals Review**, v. 53, n. 1, p. 45–47, 1 jan. 2009.

XIA, Y. et al. One-Dimensional Nanostructures: Synthesis, Characterization, and Applications. **Advanced Materials**, v. 15, n. 5, p. 353–389, 4 mar. 2003.

ZIMMER, M. GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 10, p. 2823, 2009.