

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA ENZIMA TRIPSINA COM  
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

LEIDIANE ALMEIDA SANTOS

Catalão - GO  
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação       Tese

#### 2. Nome completo do autor

Leidiane Almeida Santos

#### 3. Título do trabalho

Estudo da interação da enzima tripsina com nanopartículas de ouro.

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Jocélia Pereira De Carvalho Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 13/08/2020, às 10:38,



conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **LEIDIANE ALMEIDA SANTOS, Discente**, em 14/08/2020, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1484081** e o código CRC **CB6067E3**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.030197/2020-35

SEI nº 1484081

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA ENZIMA TRIPSINA COM  
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

**Leidiane Almeida Santos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora: Profa. Dra. Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira**

**Coorientador: Prof. Dr. Marccus Victor Almeida Martins**

Catalão - GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Leidiane Almeida  
ESTUDO DA INTERAÇÃO DA ENZIMA TRIPSINA COM  
NANOPARTÍCULAS DE OURO [manuscrito] / Leidiane Almeida  
Santos. - 2020.  
xvi, 67 f.

Orientador: Profa. Dra. Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira; co orientador Dr. Marccus Victor Almeida Martins.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Catalão, Programa de Pós Graduação em Química, Catalão, 2020.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Nanopartículas de ouro. 2. Tripsina. 3. PEG. I. Oliveira, Jocélia Pereira de Carvalho, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Ata nº **04** da sessão de Defesa de Dissertação de **Leidiane Almeida Santos**, que confere o título de Mestre(a) em **Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química da UFG - Regional Catalão

Ao/s **trinta dias do mês de julho de dois mil e vinte**, a partir da(s) **14:00 horas**, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**Estudo da interação da enzima tripsina com nanopartículas de ouro**”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira (UAEQ/UFG-RC)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) **Elaine Alves de Faria Braga (DQ-IFG-Campus Inhumas)**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **Maria Fernanda do Carmo Gurgel (UAEQ/UFG-RC)**, membro titular interno, cujas participações ocorreram por meio de videoconferência. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho, foram sugeridas alterações e complementações no trabalho final. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovado(a)** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **trinta dias do mês de julho de dois mil e vinte**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Não houve alteração no título



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Alves de Faria Braga, Usuário Externo**, em 30/07/2020, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jocélia Pereira De Carvalho Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 30/07/2020, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Fernanda Do Carmo Gurgel, Professora do Magistério Superior**, em 30/07/2020, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Santos Andrade, Coordenador de Pós-graduação**, em 04/08/2020, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1464530** e o código CRC **790D2143**.



---

**Referência:** Processo nº 23070.030197/2020-35

SEI nº 1464530

## DEDICATÓRIA

*Ao meu filho Guilherme, minha maior motivação.  
Aos meus pais, Márcia e José, minhas inspirações.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida que me foi concedida e pelas dádivas que recebo diariamente.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira e ao meu coorientador, Dr. Marccus Victor Almeida Martins, pelos conhecimentos compartilhados e pelo apoio durante essa jornada.

Agradeço aos meus colegas de mestrado, que compartilharam de seu conhecimento, discussões e comentários que enriqueceram este projeto, além das risadas nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Márcia e José, as minhas irmãs, Franciely e Laurena, e ao meu filho, Guilherme, que estão sempre ao meu lado me motivando e auxiliando em todas as minhas decisões e que me apoiaram nessa incrível jornada.

À Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão/GO e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade deste mestrado.

Ao Laboratório Multidisciplinar de Nanomateriais (LMN) pela disponibilidade do espaço para realização da pesquisa.

À Universidade de São Paulo (USP-São Carlos) pelas análises realizadas em seus laboratórios e por toda parceria formada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida.

Muito obrigada!

## RESUMO

As proteases constituem um dos maiores grupos de enzimas e têm diversas aplicações que variam desde processos alimentícios a farmacêuticos. Dentro desse grupo, a Tripsina, uma serino protease excretada pelo pâncreas como uma pró-enzima inativa (tripsinogênio), está presente nos sistemas digestivos de vertebrados e invertebrados. Como a protease é uma das classes de enzimas mais abundantes, há diversos estudos sobre sua importância fisiológica. Alguns estudos mostram, por exemplo, o papel significativo da interação de nanomateriais com biomoléculas enzimáticas, tais como as proteases. Em comparação com pequenas moléculas, as estruturas em nanoescala expressam diversas propriedades físicas e químicas, as quais podem ser associadas a biomoléculas visando potencializar suas funções. Um dos nanomateriais mais utilizados são as Nanopartículas de ouro (NpAu), as quais são produzidas para várias aplicações, por exemplo, em terapêutica, detecção e diagnóstico, sensoriamento químico e biológico e campos de catálise. Dentro deste contexto, esse trabalho reporta duas rotas de Sínteses de Nanopartículas de ouro associadas a enzima Tripsina. A metodologia das Sínteses foi embasada no método tradicional de Turkevich seguida de adaptações. Os resultados mostraram que as duas metodologias foram eficientes, gerando os sistemas biconjugados esperados, conforme pode ser comprovado pelas análises por espectroscopia na região do UV-Vis. O infravermelho (FTIR) confirmou as interações entre a enzima e a superfície da Nanopartícula de ouro. Morfologicamente, as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) mostraram Nanopartículas esféricas e sem aglomerações. O biosistema Nanopartícula de ouro e Tripsina se mostrou estável durante o período de 30 dias. Esse biosistema mostra-se promissor para o entendimento de futuras aplicações que envolvem o processo de interação entre a enzima e seu respectivo substrato.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de ouro, Tripsina, PEG.

## ABSTRACT

Proteases are one of the largest groups of enzymes and have several applications ranging from food processes to pharmaceuticals. Within this group, Trypsin, a serine protease excreted by the pancreas as an inactive, proenzyme (trypsinogen), is present in the digestive systems of vertebrates and invertebrates. As protease is one of the most abundant classes of enzymes, there are several studies on its physiological importance. Some studies show, for example, the significant role of the interaction of nanomaterials with enzymatic biomolecules, such as proteases. In comparison with small molecules, nanoscale structures express several physical and chemical properties, which can be associated with biomolecules in order to enhance their functions. One of the most used nanomaterials are gold nanoparticles (NpAu), which are produced for various applications, for example, in therapeutics, detection and diagnosis, chemical and biological sensing and catalysis fields. Within this context, this work reports two routes of synthesis of gold nanoparticles associated with the enzyme Trypsin. The synthesis methodology was based on the traditional Turkevich method followed by adaptations. The results showed that the two methodologies were efficient, generating the expected biconjugate systems, as can be proved by the spectroscopy analyzes in the UV-Vis region. The infrared (FTIR) confirmed the interactions between the enzyme and the surface of the gold nanoparticle. Morphologically, the images obtained by scanning electron microscopy (SEM) transmission (TEM) showed nanoparticles spherical and without agglomerations. The gold nanoparticle and trypsin biosystem proved to be stable over the 30-day period. This biosystem is promising for the understanding of future applications that involve the interaction process between the enzyme and its respective substrate.

**Keywords:** Gold nanoparticles, trypsin, PEG.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> A taça de Lycurgus, em exposição no British Museum, vista na luz refletida (direita) e na luz transmitida (esquerda). .....  | 20 |
| <b>Figura 2:</b> Esquema da interação de uma radiação eletromagnética com uma nanoesfera metálica.....  | 21 |
| <b>Figura 3:</b> Abordagens para síntese de nanopartículas.....   | 23 |
| <b>Figura 4:</b> Esquema de estabilização de Nanopartículas evitando a aglomeração e agregação.....   | 23 |
| <b>Figura 5:</b> Fatores que influenciam as interações na interface bio-nano. ....  | 25 |
| <b>Figura 6:</b> Mecanismo catalítico das Serino Proteases.....   | 28 |
| <b>Figura 7:</b> Bolsa S1 da enzima Tripsina (à esquerda); Especificidade da enzima Tripsina (à direita).....   | 30 |
| <b>Figura 8:</b> Estrutura da enzima Tripsina pancreática bovina nativa. ....   | 30 |
| <b>Figura 9:</b> Soluções de Tripsina (a), HAuCl <sub>4</sub> (b) e NpAu-Tri (c).....   | 36 |
| <b>Figura 10:</b> (a) Espectro de UV-Vis para NpAu-Tri (vermelho), HAuCl <sub>4</sub> (azul) e Tripsina (preto). (b) Representação da estrutura secundária e (c) estrutura de resíduos de aminoácidos da Tripsina: site PDB-1H4A. Estruturas químicas dos aminoácidos Fenilamina (d) e Triptofano (e). .... | 37 |
| <b>Figura 11:</b> Espectro de UV-Vis da suspensão de Nanopartículas destacando a elevação na linha de base devido a RPS.....  | 39 |
| <b>Figura 12:</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura.....   | 40 |
| <b>Figura 13:</b> Espectros de FTIR para a Tripsina (linha preta) e NpAu-Tripsina (linha vermelha). ....  | 41 |
| <b>Figura 14:</b> (a) Espectros de absorção na região do UV-vis para estudo de estabilidade e (b) gráfico da absorção máxima em função dos dias.....  | 43 |
| <b>Figura 15:</b> Estrutura química do Polietileno glicol (PEG). ....   | 45 |
| <b>Figura 16:</b> Fotografia das soluções (a) de Tripsina; (b) HAuCl <sub>4</sub> ; e (c) NpAu-PEG-Tri. ....  | 45 |
| <b>Figura 17:</b> Espectros de absorção na região do UV-Vis para (a) Tripsina (preto), HAuCl <sub>4</sub> (azul) e NpAu-PEG-Tri (vermelho). (b) Comparação entre os perfis espectroscópicos para NpAu-Tri (linha pontilhada) e NpAu-PEG-Tri (linha sólida)....  | 47 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 18:</b> Espectros de FTIR para o sistema NpAu-PEG-Tri (linha preta); Polietilenoglicol (linha azul) e Tripsina (linha vermelha).....                    | 49 |
| <b>Figura 19:</b> Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das NpAu-PEG-Tri (a) e (c); Histogramas referentes às Nps (b) e (d).....                       | 51 |
| <b>Figura 20:</b> Espectros de absorção na região do UV-Vis correlacionando as características morfológicas com o posicionamento da BRPS em cada biossistema..... | 53 |
| <b>Figura 21:</b> Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico.....   | 54 |
| <b>Figura 22:</b> (a) Simulação computacional (site PDB) da enzima Tripsina. (b) Esquema proposto para o sistema NpAu-PEG-Tri. ....                               | 56 |
| <b>Figura 23:</b> (a) Espectros de absorção na região do UV-vis para estudo de estabilidade e (b) gráfico da absorção máxima em função dos dias.....              | 58 |

**LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Classificação internacional das enzimas.....              | 26 |
| <b>Tabela 2:</b> Lista de reagentes. ....                                  | 33 |
| <b>Tabela 3:</b> Principais picos apresentados no espectro de FTIR. ....   | 41 |
| <b>Tabela 4:</b> Principais picos apresentados nos espectros de FTIR. .... | 50 |

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

|   |  |
|---|--|
| <b>BRPS</b>                             | Banda de ressonância plasmônica de superfície                                    |
| <b>DH</b>                               | Diâmetro hidrodinâmico   |
| <b>EDL</b>                              | Espalhamento dinâmico de luz   |
| <b>FTIR</b>                             | Fourier transform infrared (infravermelho com transformada de Fourier)           |
| <b>IP</b>                               | Índice de polidispersão  |
| <b>IR</b>                               | Infrared (infravermelho)   |
| <b>MET</b>                              | Microscopia eletrônica de transmissão  |
| <b>MEV</b>                              | Microscopia eletrônica de varredura  |
| <b>Np</b>                               | Nanopartícula  |
| <b>Nps</b>                              | Nanopartículas   |
| <b>NpAu-PEG-Tri</b>                     | Nanopartículas de ouro bioconjugadas à Tripsina na presença do polietilenoglicol |
| <b>NpAu-Tri</b>                         | Nanopartículas de ouro bioconjugadas à Tripsina                                  |
| <b>RPS</b>                              | Ressonância plasmônica de superfície   |
| <b>Tri</b>                              | Tripsina   |
| <b>UV-Vis</b>                           | Espectroscopia na região do Ultravioleta e visível                               |
| <b>AuCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O</b> | Cloreto de ouro triidratado  |
| <b>HAuCl<sub>4</sub></b>                | Ácido tetracloroáurico   |
| <b>NaBH<sub>4</sub></b>                 | Borohidreto de sódio   |
| <b>PEG</b>                              | Polietilenoglicol  |
| <b>pH</b>                               | Potencial hidrogeniônico   |
| <b>kDa</b>                              | Quilodalton  |

|                        |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| <b>KBr</b>             | Brometo de potássio           |
| <b>K<sub>cat</sub></b> | Constante de catálise         |
| <b>K<sub>m</sub></b>   | Constante de Michaelis-Menten |
| <b>ζ</b>               | Potencial Zeta                |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....   | 17 |
| <b>1.1 Nanotecnologia</b> .....   | 18 |
| <b>1.2 Nanopartículas de ouro</b> .....   | 19 |
| <b>1.3 Síntese de Nanopartículas de Ouro</b> .....  | 22 |
| <b>1.4 Matrizes de estabilização de Nps</b> .....   | 24 |
| <b>1.5 Interação entre proteínas e Nanopartículas</b> .....                                   | 24 |
| <b>1.6 Serino proteases</b> .....   | 26 |
| <b>1.7 Tripsina</b> .....   | 29 |
| <b>2.0 OBJETIVOS</b> .....  | 32 |
| <b>2.1 Objetivo Geral</b> .....   | 32 |
| <b>2.2 Objetivos específicos</b> .....  | 32 |
| <b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 33 |
| <b>4.1 Materiais:</b> .....   | 33 |
| <b>4.2 Procedimento experimental:</b> .....   | 33 |
| 4.2.1 Síntese da NpAu-Tri (Método 1): .....   | 33 |
| 4.2.2 Síntese da NpAu-PEG-Tri (Método 2): .....   | 33 |
| <b>4.3 Técnicas de caracterização:</b> .....  | 34 |
| 4.3.1 Espectrofotometria na região do UV-Vis.....   | 34 |
| 4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) .....                                  | 34 |
| 4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....  | 34 |
| 4.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....  | 34 |
| 4.3.5 Espalhamento dinâmico de luz (EDL).....   | 35 |
| 4.3.6 Potencial Zeta .....  | 35 |
| <b>5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 36 |
| <b>5.1 Síntese das NpAu-Tri – Método 1</b> .....  | 36 |
| <b>5.2 Espectroscopia de absorção no UV-Vis</b> .....   | 37 |
| <b>5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....                                    | 39 |
| <b>5.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</b> ..... | 40 |
| <b>5.5 Estudo da estabilidade das NpAu-Tri</b> .....  | 42 |
| <b>5.6 Síntese das NpAu-Tri – Método 2</b> .....  | 44 |
| <b>5.7 Espectroscopia de absorção no UV-Vis</b> .....   | 46 |
| <b>5.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b> .....                                  | 51 |

|   |    |
|---|----|
| <b>5.10 Espalhamento dinâmico da Luz (EDL)</b> .....      | 54 |
| <b>5.11 Potencial Zeta (<math>\zeta</math>)</b> .....     | 56 |
| <b>5.12 Estudo da estabilidade das NpAu-PEG-Tri</b> ..... | 57 |
| <b>6.0 CONCLUSÃO</b> .....                                | 59 |
| <b>7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....               | 60 |

## 1.0 INTRODUÇÃO

O interesse pelo ouro sempre esteve presente na história da humanidade, mas foram nas últimas décadas que a comunidade científica também percebeu a potencialidade de aplicação desse elemento, em uma escala até então pouco usual, a nanométrica. Nesta escala o ouro apresenta propriedades que não são observadas em escala macro, dentre elas, a capacidade de ser um ótimo catalisador, quando em tamanhos menores que 5 nm e a mudança de coloração que passa a ser vermelha, devido ao fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície (RPS) que ocorre devido à excitação coletiva de elétrons de condução e tem dependência com o tamanho, forma e estrutura das partículas (LOUIS & PLUCHERY, 2012; DYKMAN & KHLEBTSOV, 2018). As propriedades óticas, físicas e químicas exclusivas das Nanopartículas de ouro aliadas à baixa reatividade desse elemento em escala nanométrica, faz com que elas tenham uma ampla variedade de aplicações em diversas áreas. Na biologia e medicina, essas propriedades vêm sendo bastante exploradas e as aplicações incluem biossensores, detecção e fototermólise de microrganismos e células cancerígenas, entrega dirigida de drogas, peptídeos, DNA e antígenos, entre outras (DYKMAN & KHLEBTSOV, 2018).

Estrategicamente, a realização de estudos sobre como ocorre a interação entre Nanopartículas e a superfície de algumas enzimas são formas de entender e até melhorar o desempenho de funções enzimáticas quando na presença destes nanomateriais. Além disso, o ouro, em tamanho nanométrico, por mais que seja considerado não-toxico pode induzir um funcionamento não usual na célula podendo trazer riscos à saúde (ZHU et al. 2013; NEELY et al. 2013). Esses estudos trazem informações quanto ao tipo de interação que ocorre, como ocorre e como essas informações podem ajudar na aplicabilidade desses sistemas bioconjugados.

Diante disto, esse trabalho apresenta dois métodos de Síntese de Nanopartículas de ouro bioconjugadas a enzima Tripsina (com e sem a presença do polietilenoglicol), visando o entendimento de aspectos tais como a melhor rota sintética, a interação Nanopartícula-enzima, e a busca por uma abordagem que leve a formação do bionanomaterial mais estável.

## 1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é o processo que envolve a fabricação, caracterização e manipulação de dispositivos ou materiais que apresentem dimensões de 1 a 100 nanômetros. O prefixo “nano” significa a bilionésima ( $10^{-9}$ ) parte de uma unidade (1/1.000.000.000) ou cerca de um centésimo de milésimo da espessura de uma folha de papel. A nanoescala engloba diversos exemplos de partículas que ocorrem naturalmente, como partículas de fumaça, cinzas vulcânicas, aerossol marítimo, de fontes antropogênicas, e etc. Em termos de biologia, a nanoescala é o tamanho padrão de componentes celulares importantes, como o DNA, proteínas, paredes celulares, células membranas e compartimentos (AVVAKUMOVA, 2012). Materiais que são reduzidos a esses limites apresentam propriedades físicas e químicas distintas das propriedades apresentadas por esses materiais em macroescala. Essas propriedades despertaram o interesse de pesquisas nas últimas décadas, e o seu impacto na economia pode ultrapassar US\$ 3 trilhões até 2020. (DUNCAN, 2011)

O emprego da nanotecnologia se estende a diferentes áreas, podendo ser aplicada de diversas maneiras. Na indústria alimentícia, alguns estudos já usam a nanotecnologia na detecção de moléculas orgânicas que possam indicar deterioração ou alteração do produto. Outro exemplo é o estudo realizado por Ai e colaboradores (2009), onde Nanopartículas de ouro (NpAu) funcionalizadas com um derivado do ácido cianúrico são utilizadas para detectar melamina - um composto adicionado ilegalmente aos produtos lácteos para produzir uma leitura incorretamente alta na medição do teor de proteínas com base no nitrogênio total - no leite cru.

Outra área na qual a nanotecnologia vem sendo amplamente empregada é na medicina, onde as aplicações vão desde diagnóstico até métodos terapêuticos. Neste sentido, um estudo realizado por Neely e colaboradores (2013), permitiu a detecção de até cinco espécies relevantes de *Candida* a partir da Ressonância Magnética T2 mediada por Nanopartículas superparamagnéticas. Este teste foi aprovado pela organização *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América e testes similares estão sendo desenvolvidos para diagnósticos bacterianos.

Na terapêutica, micropartículas são amplamente usadas no transporte de medicamentos e nos últimos anos essa metodologia vem abrangendo a escala nano, inclusive no tratamento do câncer. Nanoterapêuticos direcionados podem administrar o tratamento diretamente na célula cancerígena, diminuindo reações adversas causadas

pelo contato da substância potencialmente tóxica com tecidos saudáveis. (HRKACH, et al. 2012)

A nanotecnologia tem como objetivo projetar e fabricar novos materiais, desta forma, a procura por diferentes tipos de entidades moleculares para formar nanoestruturas tem sido buscada. Peptídeos e domínios proteicos têm recebido bastante atenção como blocos de construção por sua capacidade de formar estruturas tridimensionais complexas e incorporar propriedades químicas e físicas diferentes e versáteis (DOLES, et al. 2012). A associação de nanomateriais a moléculas biológicas é conhecida como bionanotecnologia, área científica que vem ganhando destaque e cada vez mais pesquisas relacionadas. As Nanopartículas de metais nobres têm sido muito utilizadas, graças as suas propriedades inertes frente a sistemas biológicos, causando assim, menos riscos de contaminação.

## **1.2 Nanopartículas de ouro**

Embora o interesse pela nanotecnologia seja relativamente recente, ela já é conhecida e aplicada há séculos. Nanopartículas de ouro (NpAu) e Nanopartículas de prata (NpAg), por exemplo, são utilizadas há mais de 2000 anos na fabricação de utensílios domésticos, sendo o mais conhecido, a Taça de Lycurgus (Figura 1), produzida pelos romanos e que possui um dicróismo vermelho-verde, apresentando a cor verde na luz refletida normal e coloração vermelha quando a luz é transmitida através dela. Esta propriedade ocorre devido à presença de Nanopartículas de Ag-Au de 1-100 nm de tamanho que resultam em cores distintas das apresentadas pelo material na macroescala correspondente (FREESTONE, et al. 2007).

**Figura 1:** A taça de Lycurgus, em exposição no British Museum, vista na luz refletida (direita) e na luz transmitida (esquerda).

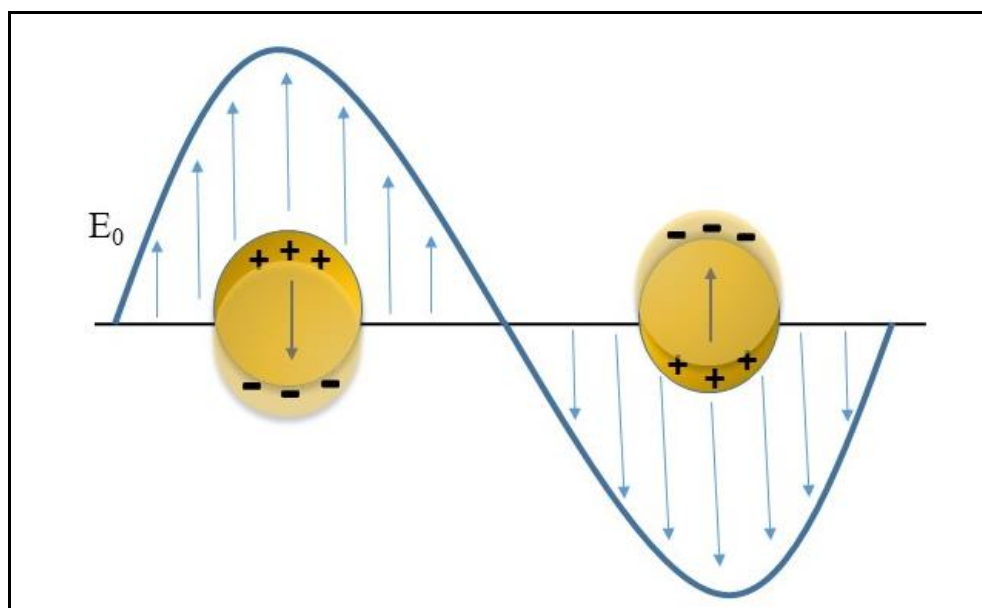


Fonte: Acervo digital “The British Museum” (<https://www.britishmuseum.org/collection>)

O tamanho e a forma das NpAu são de extrema importância no que diz respeito às propriedades óticas apresentadas devido a relação direta dessas com um fenômeno que ocorre em Nanopartículas de metais nobres, como o ouro. Esse fenômeno é conhecido como Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS).

A ressonância plasmônica de superfície ocorre quando uma partícula de metal é exposta à luz, ocorrendo uma indução causada pelo campo eletromagnético da luz que provoca uma oscilação coerente e coletiva dos elétrons livres do metal, que causa uma separação de carga em relação à rede iônica, formando uma oscilação dipolar ao longo da direção do campo elétrico da luz (Figura 2). A amplitude da oscilação atinge o máximo em uma frequência específica sendo chamada ressonância plasmônica de superfície. Esse fenômeno ocorre com qualquer Nanopartícula metálica, porém é muito mais intensa com partículas de metais nobres. E a intensidade depende de fatores como o tamanho da partícula, forma, estrutura, composição e a constante dielétrica do meio envolvente, como teoricamente descrita pela teoria de Mie (HUANG, 2010).

**Figura 2:** Esquema da interação de uma radiação eletromagnética com uma nanoesfera metálica.



Fonte: Adaptado de SANTOS (2016).

As propriedades apresentadas por Nanopartículas de ouro, tais como alto coeficiente de absorção de raios X, facilidade de manipulação sintética permitindo o controle preciso das propriedades físico-químicas da partícula, forte afinidade de ligação a tióis, dissulfetos e aminas, propriedades ópticas ajustáveis únicas, e propriedades eletrônicas distintas (ELAHI, 2018), fazem com que o estudo em torno dessa tecnologia esteja em ascensão contínua, e as aplicações às quais esses estudos se direcionam englobam as mais distintas áreas.

As propriedades citotóxicas de NpAu levam a uma grande aplicação na biomedicina e medicina. Um estudo recente voltado a oncologia e com o objetivo de minimizar a ressecção de tecidos saudáveis durante oncocirurgias apresentou resultados satisfatórios utilizando nanobolhas plasmônicas pré-tratadas com ouro para diagnóstico, detecção intra-operatório e tratamento para células cancerígenas residuais. Esse estudo baseou-se em uma técnica que utiliza a segmentação sistêmica do ouro (para formar grupos de ouro nos tumores) geração local de nanobolhas plasmônicas com um único pulso a laser de baixa energia e detecção acústica, em combinação com a cirurgia padrão, para detecção e ressecção, apresentando alta sensibilidade, especificidade, velocidade e potencial de tradução das células cancerígenas. A toxicidade dos conjugados de ouro *in vivo*, foi monitorada e os resultados mostraram que elas apresentam segurança, ou seja, baixa toxicidade (LUKIANOVA-HLEB, et al. 2016).

Dentre outras possíveis aplicações pode-se citar, também, a birotulagem, dispositivos de biossensores para a detecção de vírus e bactérias, administração de medicamentos, imagem de tecidos/tumores, fototerapia e fototermoterapia e identificação imuno-cromatográfica de patógenos em espécimes clínicos. As Nanopartículas de ouro são biocompatíveis, inertes, e se ligam a uma grande variedade de biomoléculas, como proteínas/enzimas, DNA e aminoácidos, o que possibilita essa ampla variedade de aplicações (CHEN, et al. 2018; GOPINATH et al. 2013).

### 1.3 Síntese de Nanopartículas de Ouro

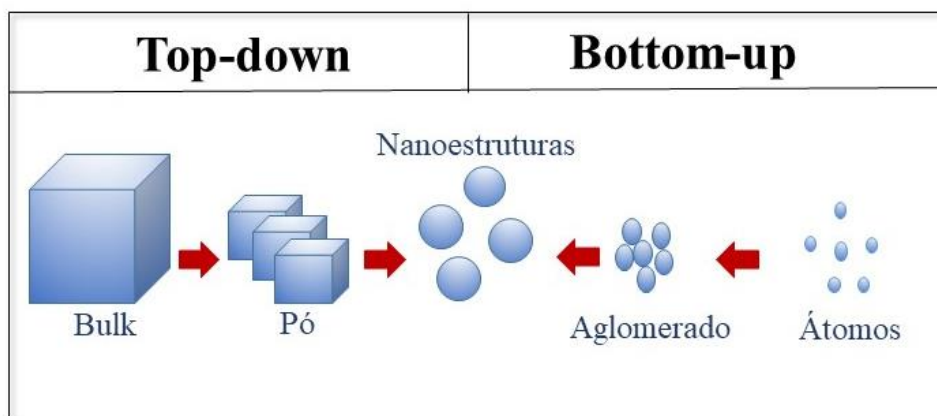
A síntese de nanomateriais é uma etapa muito importante, pois o método deve ser adequado às propriedades visadas e especificidades da sua aplicação. Os processos escolhidos devem ser monitorados e proporcionar controle de possíveis problemáticas como agregação, e serem menos dispendiosos.

As diversas técnicas utilizadas para a preparação de Nanopartículas se baseiam em duas principais abordagens (Figura 3): *Top-down* (de cima para baixo, em tradução livre) e *Bottom-up* (de baixo para cima, em tradução livre). Na abordagem *bottom-up*, os materiais em nanoescala são desenvolvidos a partir de precursores atômicos ou moleculares que podem reagir e crescer em tamanho, ou se auto-montar em estruturas mais complexas. A abordagem *top-down* esculpe estruturas em nanoescala por meio do desgaste controlado de materiais de sólidos maiores (YU, 2013). As abordagens *bottom-up* são as mais eficientes para produção de Nps de metais nobres devido ao menor desperdício de material de partida e menor gasto energético, quando comparadas às técnicas *top-down*, além de proporcionar um maior controle de tamanho.

Dentro das técnicas *top-down*, uma das mais utilizadas para produção de Nanopartículas é a síntese química. Nesta técnica, as Nps podem ser sintetizadas por meio da redução de um íon metálico dando origem a um colóide. Uma das principais rotas sintéticas para produção de Nanopartículas de ouro é pela reação de oxirredução do íon de ouro usando citrato de sódio como agente redutor e estabilizante, sendo este método relatado por Turkevich e colaboradores (1951). Porém, é possível realizar a síntese com outros agentes redutores, tais como borohidreto de sódio, que por ser um

reductor forte gera Nps menores e a síntese é mais rápida, bem como reductores mais fracos, como ácido fórmico, ácido ascórbico, entre outros (AVVAKUMOVA, 2012).

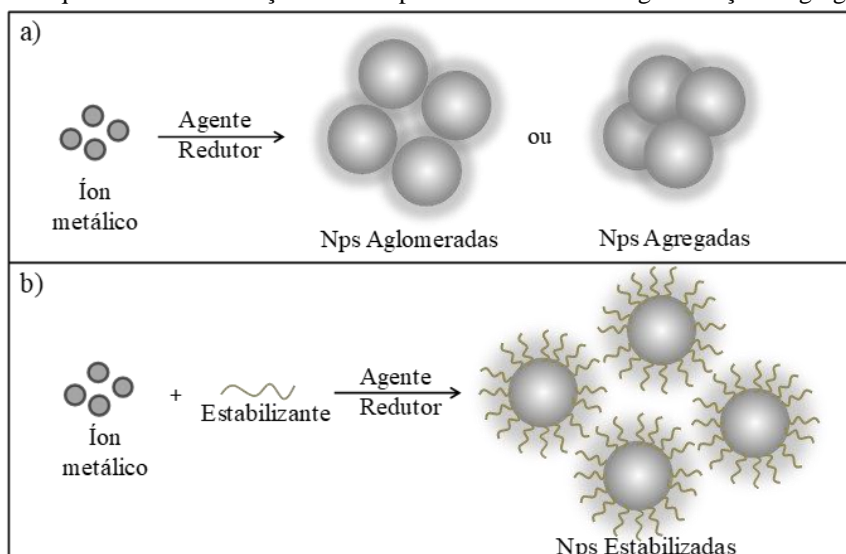
**Figura 3:** Abordagens para síntese de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de MENDES (2015).

Um dos grandes desafios, em se tratando de síntese de Nanopartículas, é a estabilização do crescimento da Np. Devido a etapas de nucleação e crescimento da Np, quando não controlados, essas etapas podem levar, por muitas vezes, a aglomeração ou agregação de partículas, diminuindo os efeitos em escala nanométrica. Entretanto, o uso de matrizes estabilizantes é uma alternativa para que não haja aglomeração ou agregação das Nanopartículas (BARUAH, 2017). O esquema da Figura 4 (a) e (b) sumariza a atuação de uma matriz estabilizante proporcionando a estabilização de Nanopartículas metálicas.

**Figura 4:** Esquema de estabilização de Nanopartículas evitando a aglomeração e agregação.



Fonte: Próprio autor.

#### **1.4 Matrizes de estabilização de Nps**

A existência de uma matriz na superfície de uma Nanopartícula metálica é primordial devido à capacidade de inibir forças atrativas, e forças de Van der Waals, com isso a presença dessa matriz ocasiona forças repulsivas, as quais são geradas por impedimento estérico. Naturalmente, a superfície de uma Np é repleta de cargas positivas ou negativas, as quais podem atuar como estabilização eletrostática. Outra maneira de ocorrer a estabilização de uma Np é através do próprio agente redutor, como ocorre no caso de se utilizar o citrato de sódio. No entanto, por vezes, essa estabilização não é eficiente devido às forças de Van der Waals serem forças de maior intensidade, assim, é necessário o uso de uma matriz na rota de síntese. Neste sentido, a literatura aborda inúmeras estratégias de matrizes como, por exemplo, polímeros, tióis, biopolímeros, enzimas, etc. (TIWARI, 2011; SIMPSON, 2010; SUNDARAMURTHY, 2015). Como consequência dessa interação entre a matriz estabilizante e a superfície da Np, suas propriedades físico-químicas são alteradas. Por exemplo, a coloração que está relacionada ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (RPS). Em escala nanométrica o ouro coloidal apresenta uma coloração avermelhada, e essa coloração pode variar em função do diâmetro da Np e o meio no qual ela está inserida.

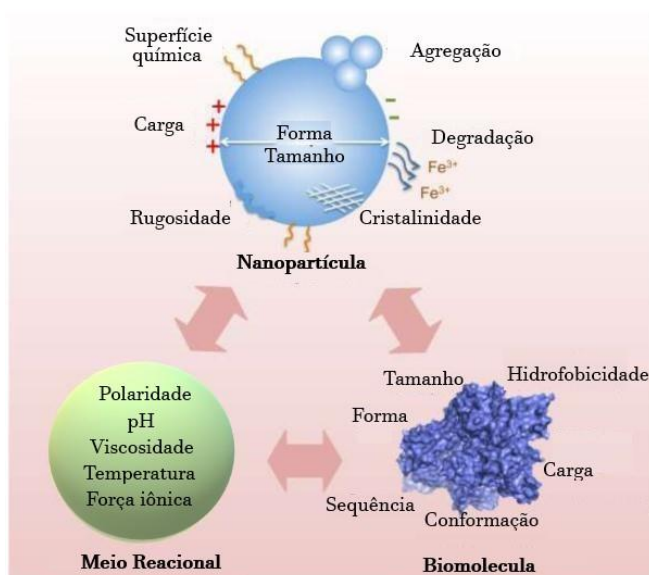
As Nanopartículas de ouro apresentam uma ampla variedade de aplicações biológicas, pois apresentam propriedades físicas e químicas específicas. A bioconjugação de NpAu com moléculas biológicas, como enzimas pode ser benéfica devido a estabilização promovida, além de despertar muito interesse nas aplicações das Nanopartículas de ouro em diferentes áreas biomédicas, incluindo biossensores, detecção e controle de micro-organismos, direcionamento de medicamentos, ensaios de imunidade, monitoramento de células biológicas (NAIMI SHAMEL, 2019; BARUAH, 2017).

#### **1.5 Interação entre proteínas e Nanopartículas**

Em sistemas biológicos, como proteínas, a interação com os nanomateriais pode ocorrer de diversas maneiras, dependendo de fatores como o tipo de célula, empregando diferentes rotas de captação ou visando diferentes organelas (ELAHI, KAMALI, BAGHERSAD, 2018). Outros fatores também afetam as interações de um sistema bio-nano como tamanho, superfície, carga de superfície e a

hidrofobicidade, conforme visto no esquema proposto por MU e co-autores (2014) na Figura 5. E quando bem controladas essas características influenciam drasticamente na rugosidade, cristalinidade e estabilidade do nanobiomaterial.

**Figura 5:** Fatores que influenciam as interações na interface bio-nano.



Fonte: MU, et al. (2014) (adaptada).

Em relação à interação Nanopartícula-proteína, alguns cenários são possíveis; (i) é possível que não afete as propriedades da Np ou a função proteica, (ii) que haja modificação ou perturbação na estrutura proteica diminuindo sua funcionalidade devido a reatividade da superfície da Np, (iii) a ligação às proteínas pode ocultar a superfície das partículas, reduzindo ou alterando suas propriedades, e (iv) devido à grande área superficial da Np, poderia haver interação com uma grande quantidade de proteína, aumentando sua atividade (BROWN, et al. 2010).

Há uma grande quantidade de estudos que analisam esse tipo de interação, por exemplo, Turci e colaboradores (2010) avaliaram a interação de Nanopartículas de silício e quatro tipos de proteínas com diferentes tipos de carga superficial, neste estudo a quantidade e a distribuição de proteínas na superfície sólida foram influenciadas pela carga líquida de proteínas, e a distribuição da carga superficial das proteínas foi crucial para determinar a afinidade pelo suporte sólido e a estabilidade da adsorção das duas proteínas.

Dentre os produtos de proteínas, destacam-se as enzimas que atuam como catalisadoras de quase todas as reações celulares, e que se tornaram alvo da nanotecnologia. As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reações que catalisam e dentre elas estão as Serino proteases, classificadas como hidrolases e que podem ser empregadas na “Síntese verde” de Nanopartículas (SIRITAPETAWEE, et al. 2018), como moléculas alvo em ensaios eletroquímicos (SHAMSIPUR, et al. 2016), em genossensores eletroquímicos (LIU, et al. 2014), entre outros estudos.

## 1.6 Serino proteases

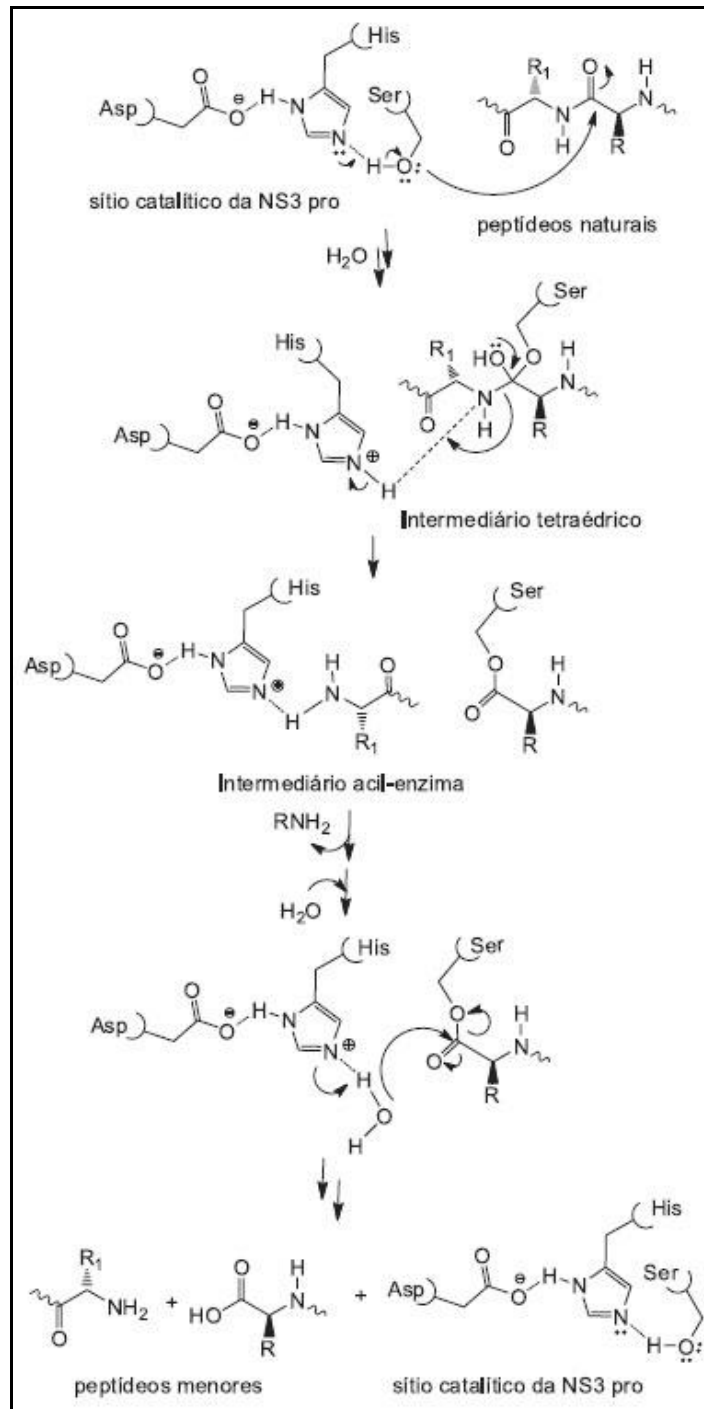
Muitos processos químicos essenciais para o funcionamento do corpo não ocorrem sem a presença de um catalisador, e outras diversas funções biológicas acontecem de forma extremamente lenta. As enzimas são capazes de resolver tais problemas por proporcionar um ambiente adequado para que uma reação possa ocorrer mais rapidamente sem afetar o equilíbrio químico da reação. O processo ocorre em uma cavidade da enzima, o sítio ativo, seu contorno é delimitado por resíduos de aminoácidos com grupos nas cadeias laterais que ligam o substrato (molécula que se liga no sítio ativo e sobre a qual a enzima age) e que catalisam a sua transformação química (NELSON & COX, 2014). As enzimas são altamente específicas para seus substratos, sendo classificadas pelo IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) em sete classes, cada uma com subclasses, com base nos tipos de reações que catalisam (Tabela 1):

**Tabela 1:** Classificação internacional das enzimas.

| Classe            | Tipo de reação catalisada                            |
|-------------------|--|
| 1. Oxidorredutase | Transferência de elétrons                            |
| 2. Transferases   | Reação de transferência de grupos                    |
| 3. Hidrolases     | Reações de hidrólise                                 |
| 4. Liases         | Clivagem de ligações                                 |
| 5. Isomerases     | Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula |



**Figura 6:** Mecanismo catalítico das Serino Proteases.



Fonte: MURI, 2014.

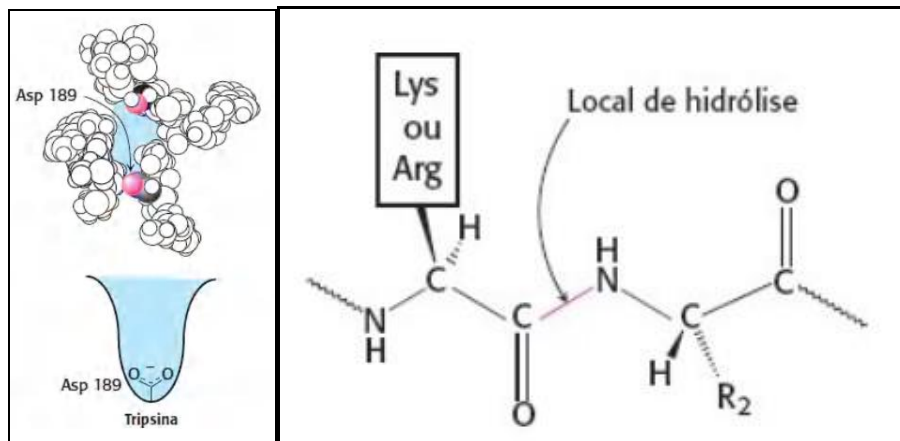
Quando resíduos na tríade catalítica são alterados, separada ou conjuntamente, ocorrem grandes mudanças na velocidade de *turn over* da enzima, alterando a constante catalítica ( $K_{cat}$ ), modificando o mecanismo enzimático e afetando a afinidade pelo substrato ( $K_m$ ). Os resíduos da tríade atuam em sinergismo contribuindo para uma atividade catalítica otimizada (CHAVEZ, 2016).

As Serino proteases têm participação em inúmeras funções fisiológicas, incluindo digestão, diferenciação celular, artrite, coagulação sanguínea, apoptose e inflamação. Por esse motivo, o seu desequilíbrio no corpo humano pode estar associado a diversos problemas de saúde, incluindo câncer, doenças inflamatórias, infecções virais, doença de Alzheimer, dentre outros. Consequentemente, as Serino proteases representam alvos terapêuticos atraentes e promissores para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, principalmente pelo aumento da compreensão das relações estrutura-atividade e cinética enzimática para esta família de enzimas (YUN, 2013).

### **1.7 Tripsina**

A Tripsina é uma Serino protease excretada pelo pâncreas como uma pró-enzima inativa (tripsinogênio), sua atuação ótima ocorre em pH 7.8, ou seja, em meio fracamente alcalino (HIROSE, 2001). Essa enzima tem 223 resíduos de aminoácidos dispostos em dois barris beta de seis filamentos (SALAR, et al. 2017), é uma proteína globular solúvel em água (CHANPHAI, 2016). Tem peso molecular de 23,3 kDa, e está presente nos sistemas digestivos de vertebrados e invertebrados, é uma enzima digestiva muito específica e catalisa a clivagem de ligações peptídicas apenas no lado carboxílico dos resíduos de lisina e arginina, conforme pode ser observado no esquema da Figura 7. Na estrutura da Tripsina existe um resíduo de aspartato (Asp 189) na base da bolsa  $S_1$  que atrai e estabiliza um resíduo de arginina ou lisina de carga positiva no substrato (BERG, 2014). Como é a protease mais abundante, há diversos estudos sobre sua importância fisiológica (SHEN, 2015; LIZZI, et al. 2016; IBARRA-GARCIA, et al. 2018).

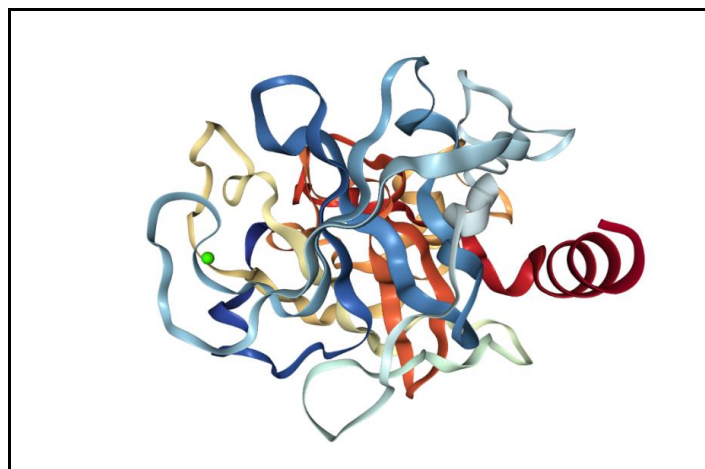
**Figura 7:** Bolsa S1 da enzima Tripsina (à esquerda); Especificidade da enzima Tripsina (à direita).



Fonte: BERG, 2014.

A Tripsina é capaz de ativar o tripsinogênio e muitas outras pró-enzimas digestivas, como o quimotripsinogênio, a proelastase, o calicreinogênio, a procarboxipeptidase e algumas prolipases, além de células pancreáticas e inflamatórias, desempenhando um papel essencial na regulação da função exócrina pancreática. O excesso ou deficiência dessa enzima está diretamente associado a algumas doenças pancreáticas, tais como pancreatite e câncer. Logo, um método simples e sensível para sua detecção em amostras biológicas é essencial para o diagnóstico precoce da doença, terapia e pesquisa biológica. A Tripsina é, também, comumente usada como um tipo de protease-modelo por ser de baixo custo, prontamente disponível e um biomarcador promissor (SATO, 2018). A enzima utilizada neste estudo é a proveniente do pâncreas bovino e sua estrutura pode ser observada na Figura 8.

**Figura 8:** Estrutura da enzima Tripsina pancreática bovina nativa.



Fonte: <https://www.rcsb.org/3d-view/1S0Q/1>

Na biomedicina e bioquímica, pesquisas que envolvem essa enzima vêm sendo cada vez mais comuns. Gu et al (2018) desenvolveram um novo método de rastreamento de aptâmeros de proteínas utilizando a Tripsina na triagem com resultados promissores, neste estudo inédito a enzima atua diretamente na otimização do sensor, mas existem diversos estudos em que ela atua como enzima modelo para o desenvolvimento de biossensores (IONESCU et al. 2008; WU et al. 2015), para o desenvolvimento de métodos de identificação e validação de ligações dissulfeto (CUI et al. 2019), no processo de digestão de proteínas para amostragem (HYEONIL et al. 2017) e diversas outras aplicações.

Já há algum tempo, a aplicação da Tripsina com Nanopartículas tem ganhado espaço e dedicação dos autores, Miao et al. (2013) utilizaram Nanopartículas de prata para detectá-la através de ensaios colorimétricos, Hinterwirth et al. (2012) analisaram a atividade, estabilidade e auto-digestão da Tripsina imobilizada em Nanopartículas de ouro, e mais recentemente foi utilizada junto a Nanopartículas magnéticas em um método de quantificação de proteínas (MARTINS et al. 2019).

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Sintetizar Nanopartículas de ouro bioconjugadas à enzima Tripsina e avaliar o comportamento do sistema bioconjugado.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar Nanopartículas de ouro através do método da redução química na presença da enzima Tripsina;
- ✓ Caracterizar espectroscopicamente (região do UV-VIS e Infravermelho FTIR) e morfolologicamente (MEV) a obtenção das NpAu-Tri;
- ✓ Caracterizar espectroscopicamente (região do UV-VIS e Infravermelho FTIR) e morfolologicamente (MET) a obtenção das NpAu-PEG-Tri;
- ✓ Realizar análises de Espalhamento dinâmico de luz (EDL) e Potencial Zeta das NpAu-PEG-Tri;
- ✓ Analisar a banda espectroscópica característica das NpAu;
- ✓ Verificar a eficiência da enzima Tripsina em atuar como agente estabilizante das NpAu.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais:

As soluções foram preparadas com água deionizada, obtida de um sistema de purificação Millipore-Q, a Tabela 2 apresenta os reagentes utilizados:

**Tabela 2:** Lista de reagentes.

| Fórmula                               | Nome                        | Procedência    |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| AuCl <sub>3</sub> . 3H <sub>2</sub> O | Cloreto de ouro triidratado | Sigma-Aldrich® |
| NaBH <sub>4</sub>                     | Borohidreto de sódio        | Synth®         |
| -----                                 | Tripsina bovina             | Sigma-Aldrich® |
| PEG 1000                              | Polietilenoglicol           | RPI®           |

Fonte: Próprio autor.

### 4.2 Procedimento experimental:

#### 4.2.1 Síntese da NpAu-Tri (Método 1):

Sob agitação constante e em temperatura ambiente, adicionou-se 20 mL de Tripsina (0,1 mg/mL) (em meio tamponado – tampão fosfato pH 7,2) e 20 mL de solução aquosa de ouro (1 mmol/L) em um béquer de 100 mL, após 1 minuto de agitação adicionou-se, gota a gota, 8,2 mL de solução de NaBH<sub>4</sub> (1 mmol/L). O sistema foi mantido sob agitação por 15 minutos.

#### 4.2.2 Síntese da NpAu-PEG-Tri (Método 2):

Sob agitação constante e em temperatura ambiente, adicionou-se 50 mL de solução aquosa de ouro (1 mmol/L) em um béquer de 100 mL, após alguns segundos de agitação, adicionou-se 0,5 mL de NaBH<sub>4</sub> (0,5 mmol/L) na temperatura de 17 °C. A solução foi mantida sob agitação por 10 minutos até a redução dos íons Au<sup>3+</sup> para Au<sup>0</sup>. Após, adicionou-se 20 mL de Polietilenoglicol (PEG) 24% e manteve-se a agitação por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se a enzima Tripsina (0,1 mg/mL) e após 5 minutos de agitação, o sistema foi desligado e a solução armazenada sob refrigeração.

### 4.3 Técnicas de caracterização:

#### 4.3.1 Espectrofotometria na região do UV-Vis

As soluções de NpAu-Tri, NpAu\_PEG-Tri, Tripsina e HAuCl<sub>4</sub> foram caracterizadas por meio da Espectroscopia na região do UV-Vis em um Espectrofotômetro UV-Vis Marca Varian, Modelo Cary 50 Scan. Neste sentido, varreduras entre 300 e 800 nm foram realizadas na solução do sal HAuCl<sub>4</sub>, e nas soluções contendo as Nanopartículas com e sem a Tripsina. A caracterização espectroscópica é uma técnica que permite identificar a formação das Nanopartículas baseada na interação da luz com a superfície da Nanopartícula. Comportamentos espectroscópicos podem evidenciar a formação do nanomaterial devido ao fenômeno das transições eletrônicas ser ausente. Além disso, a Nanopartícula de ouro apresenta a banda de ressonância plasmônica de superfície (RPS) bem reportada na literatura, o que facilita a identificação da obtenção desses nanomateriais.

#### 4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Caracterizações através de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) também foram realizadas para observação das modificações que ocorrem na estrutura da enzima. As soluções de Tripsina, NpAu-Tri, NpAu-PEG-Tri e de polietilenoglicol, foram gotejadas em pastilhas de KBr e deixadas sob vácuo para secagem controlada. As leituras foram realizadas em um Espectrofotômetro Modelo R Prestige – 21, Marca Shimadzu com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia, distribuição e tamanho das NpAu-Tri foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a análise foi feita em um Microscópio Eletrônico de Varredura Modelo JEOL JSM IT300LV.

#### 4.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para a determinação do tamanho (diâmetro) das Nanopartículas obtidas após secagem. As

imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram obtidas no equipamento JEOL JEM2100 LaB<sub>6</sub> – 200 kV. A solução de NpAu-PEG-Tri foi gotejada na grade para microscopia que foi seca durante 48 horas.

#### 4.3.5 Espalhamento dinâmico de luz (EDL)

O espalhamento dinâmico de luz (EDL) é uma técnica utilizada para determinar o raio hidrodinâmico de diversos tipos partículas em soluções coloidais. Sendo determinado pelo movimento Browniano da partícula, um movimento randômico das partículas em um líquido devido ao bombardeamento das moléculas vizinhas à partícula, e esse movimento randômico e a velocidade de seus movimentos determina o tamanho da partícula (LORBER, 2012).

As medidas de EDL foram realizadas para o biossistema NpAu-PEG-Tri em um equipamento Zetasizer Nano Series Malvern, a 25°C. As soluções foram diluídas para 50 mg L<sup>-1</sup> em PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4.

#### 4.3.6 Potencial Zeta

O potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada de solvente existente ao redor da partícula dispersa. No caso de moléculas e partículas que apresentam apenas estabilidade coloidal elétrica, um alto valor absoluto de potencial zeta ( $\pm 25$  mV) confere estabilidade, resistindo à agregação. No entanto se o potencial zeta se aproximar de zero, as forças atrativas excedem as de repulsão, gerando agregação. O potencial zeta é o potencial eletrostático gerado pela acumulação de íons na superfície da partícula e é aplicado na determinação da carga de superfície de partículas e proteínas (BALLOTTIN, 2014).

Ao interagir com o campo elétrico as partículas carregadas são atraídas para o eletrodo de carga oposta, sendo a mobilidade eletroforética, a velocidade da partícula mediante o campo elétrico (HUNTER, 1988).

As medidas de potencial zeta foram realizadas para o biossistema NpAu-PEG-Tri em equipamento Zetasizer Nano Series Malvern, a 25°C. As soluções foram diluídas para 50 mg L<sup>-1</sup> em PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4.

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

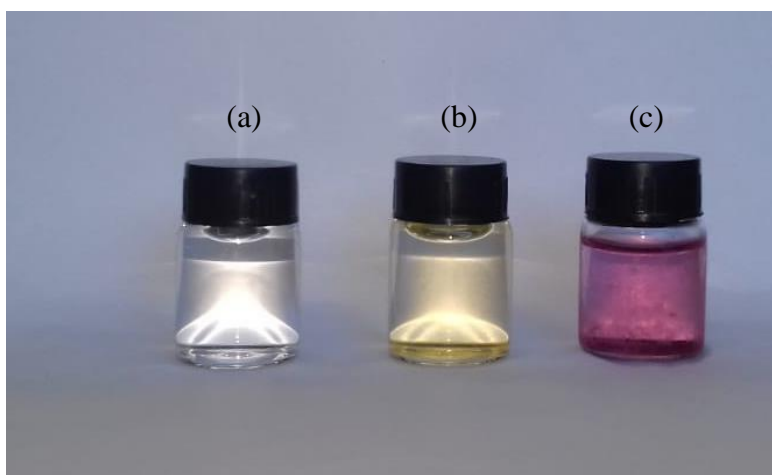
A discussão dos resultados sobre a Síntese das Nanopartículas bioconjugadas a enzima Tripsina, está dividida em duas partes: Método 1 e Método 2, conforme apresentado a seguir.

### 5.1 Síntese das NpAu-Tri – Método 1

A Síntese das Nanopartículas de ouro biconjugadas à Tripsina foi realizada baseando-se no método de Turkevich, com adaptações (TURKEVICH, 1951). Esse método consiste na adição do agente redutor na mistura das soluções de  $\text{HAuCl}_4$  e Tripsina em meio tamponado. Dessa forma as Nps foram sintetizadas na presença da enzima Tripsina, que atua como matriz de estabilização do crescimento das Nps. O agente redutor usado nessa Síntese foi o Borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) que é relativamente forte, seu método de redução é simples, reprodutível e tem eficácia comprovada na Síntese de Nanopartículas menores (BRANDALISE, 2010).

A Figura 9 mostra uma fotografia das soluções de Tripsina (a),  $\text{HAuCl}_4$  (b) e de NpAu-Tri (c), onde, claramente, é possível observar a mudança de coloração de um tom amarelo para um tom rosa após a Síntese. Essa mudança de coloração é típica do ouro em escala nanométrica, ocasionado pela redução dos íons  $\text{Au}^{3+}$  para  $\text{Au}^0$ , devido a ação do agente redutor  $\text{NaBH}_4$ . O ouro coloidal não apresenta a coloração amarela característica do ouro metálico, isso é devido as Nanopartículas absorverem na região de ~500 a ~560 nm (VIEIRA, 2012).

**Figura 9:** (a) Soluções de Tripsina, (b)  $\text{HAuCl}_4$  e (c) NpAu-Tri.

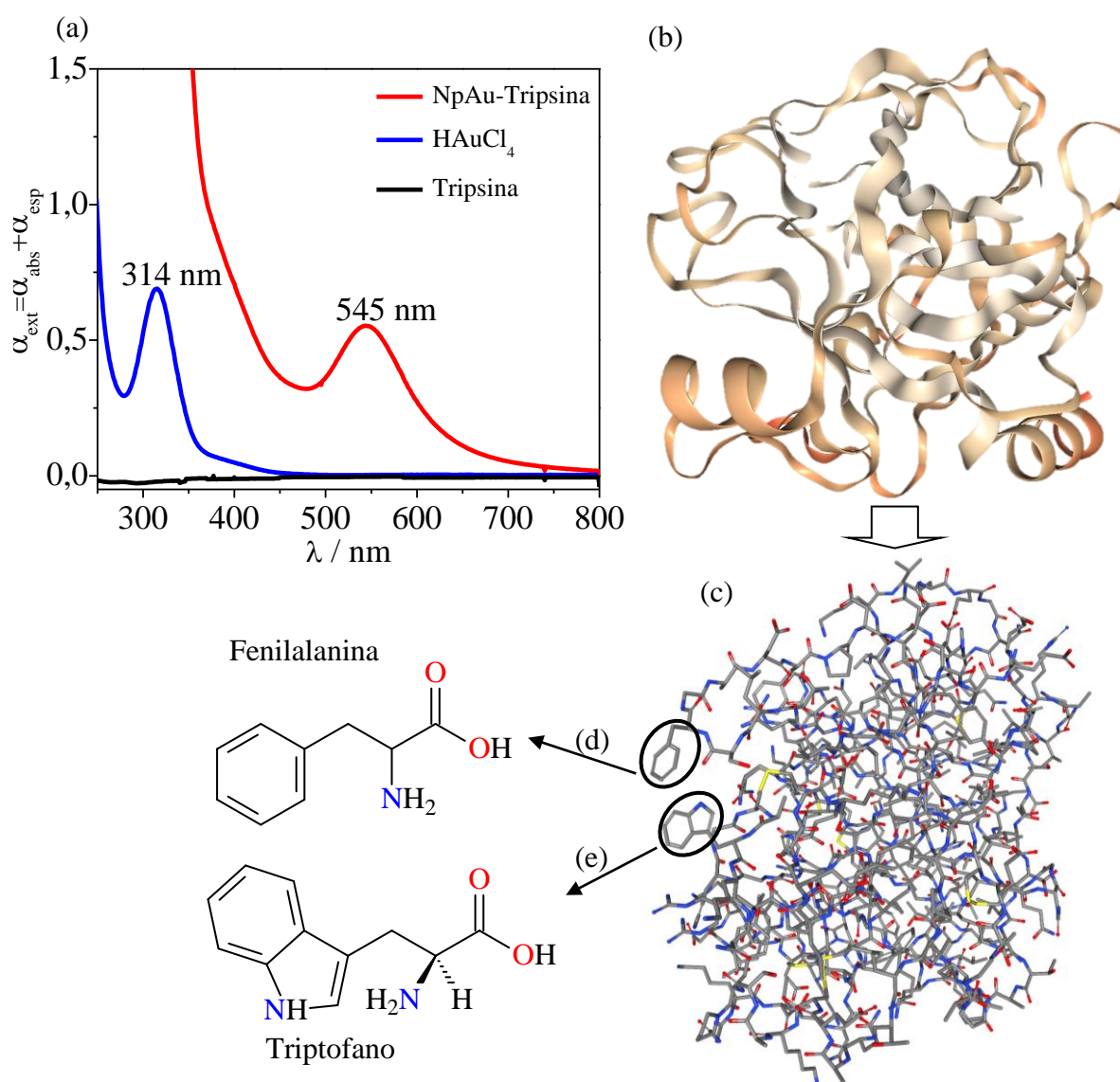


**Fonte:** Próprio autor.

## 5.2 Espectroscopia de absorção no UV-Vis

O comportamento espectroscópico da enzima Tripsina pura foi analisado e conforme observado na Figura 10 (a), no espectro de cor preta, não se observa a presença de nenhuma banda de absorção na região estudada de 250 nm a 800 nm. A Figura 10 (b) mostra a representação da estrutura secundária da enzima Tripsina, a qual é rica em fitas de inúmeros aminoácidos. Ao utilizar a simulação computacional através do site *Protein Data Bank*, observa-se que essa estrutura apresenta inúmeros aminoácidos, conforme visto na Figura 10 (c). Os cromóforos presentes, por exemplo, nos aminoácidos Fenilalanina (d) e Triptofano (e) só absorvem na região entre 200 nm e 280 nm. (VIEIRA, 2008).

**Figura 10:** (a) Espectro de UV-Vis para NpAu-Tri (vermelho), H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> (azul) e Tripsina (preto). (b) Representação da estrutura secundária e (c) estrutura de resíduos de aminoácidos da Tripsina: site PDB-1H4A. Estruturas químicas dos aminoácidos (d) Fenilalanina e (e) Triptofano.



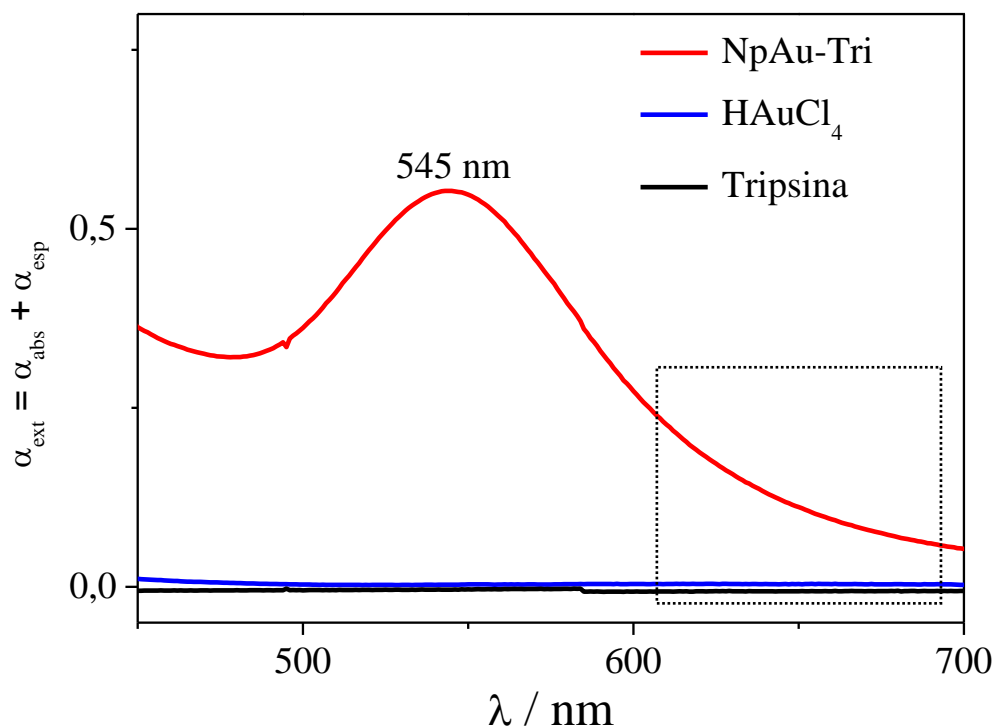
Para a solução de  $\text{HAuCl}_4$  (Figura 10 (a), linha azul), o espectro na região do UV-Vis apresenta uma banda com absorção máxima em 314 nm. Essa banda é típica das transições eletrônicas d-d do íon  $\text{Au}^{3+}$  em solução aquosa. No entanto, diferenças espectrais significativas são observadas ao realizar a varredura na solução contendo as Nanopartículas bioconjugadas com a enzima Tripsina, conforme pode ser observado na Figura 10 (a), linha vermelha. Nitidamente, nota-se a presença de uma banda com absorção máxima em 545 nm, característica da ressonância plasmônica de superfície (RPS), fenômeno de oscilação coletiva de elétrons livres, produzindo absorções inerentes ao ouro em tamanho nanométrico (AHMED, 2014).

Outra característica espectral que comprova a formação de ouro em tamanho nanométrico é o efeito do espalhamento da luz. Isso pode ser visto no aumento na linha de base, o qual é atribuível aos efeitos de espalhamento ( $\alpha_{\text{esp}}$ ) de luz por parte da superfície da Np. De acordo com a Teoria de Mie, o aumento é também atribuível à radiação absorvida pelas Nanopartículas ( $\alpha_{\text{abs}}$ ), onde a absorção total (ou coeficiente de extinção:  $\alpha_{\text{ext}}$ ) é dada pela somatória da radiação espalhada mais a radiação absorvida, conforme a Equação (1):

$$\alpha_{\text{ext}} = \alpha_{\text{abs}} + \alpha_{\text{esp}} \quad (\text{Equação 1})$$

Na Figura 11 é evidente o efeito da elevação da linha de base no espectro do sistema NpAu-Tri quando comparado ao espectro do sal de ouro. Essa elevação é típica da interação da luz com materiais que apresentem praticamente o mesmo comprimento de onda, o que provoca um espalhamento da luz pela superfície do nanomaterial, conforme visto do aumento da região do espectro de 600 a 700 nm (CRESPILHO, 2007; MARTINS, et al. 2010). As propriedades óticas e eletrônicas das Nanopartículas dependem de seu tamanho e forma, portanto o pico na BRPS está diretamente ligado a essas características, conforme será visto nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

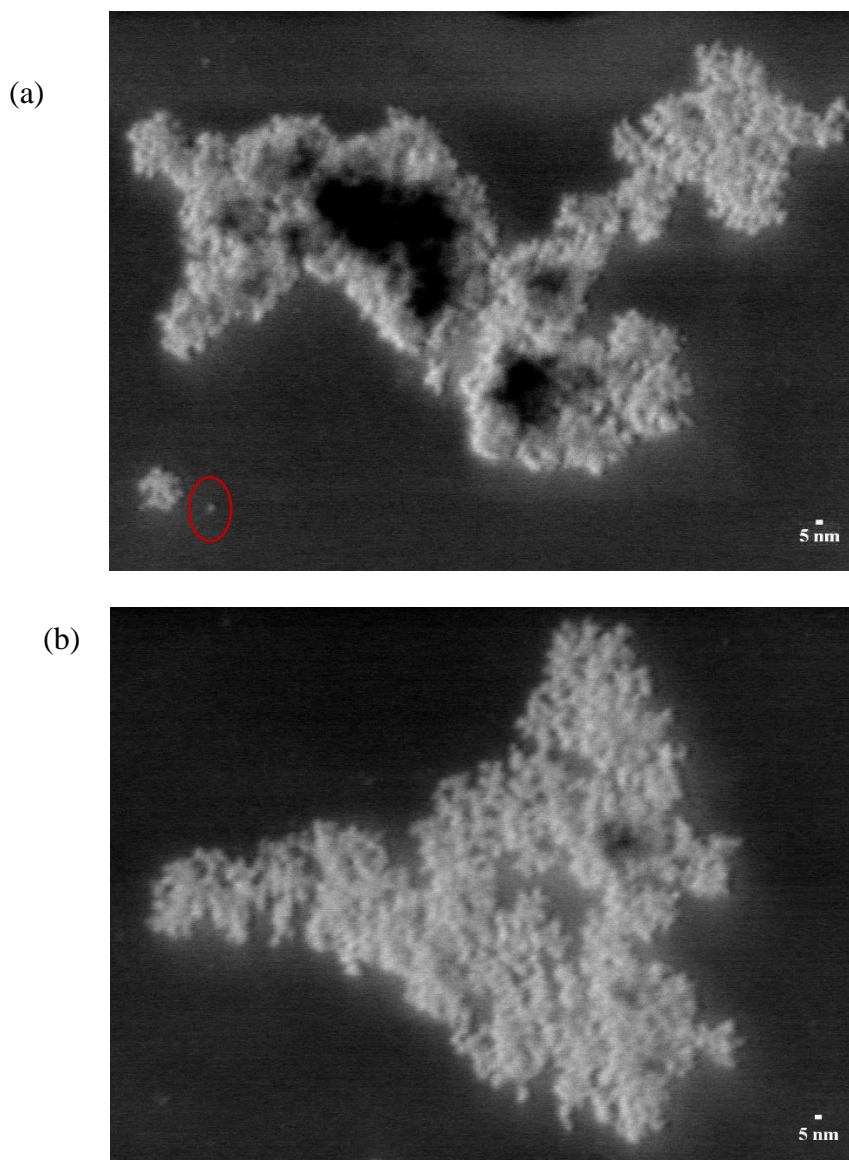
**Figura 11:** Espectro de UV-Vis da suspensão de Nanopartículas destacando a elevação na linha de base devido a RPS.



### 5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fim de se obter informações morfológicas do sistema bioconjugado NpAu-Tri, realizou-se a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Observa-se nas imagens, partículas com geometria aproximadamente esférica e com diâmetro em torno de 5 nm. Devido ao astigmatismo presente nas imagens esse valor de diâmetro foi determinado com base na Nanopartícula isolada (em destaque) da Figura 12 (a). Conforme pode ser observado na Figura 12 (a) e (b) as Nanopartículas apresentaram certa aglomeração, o que também pode ser observado no teste de estabilidade que será discutido mais à frente.

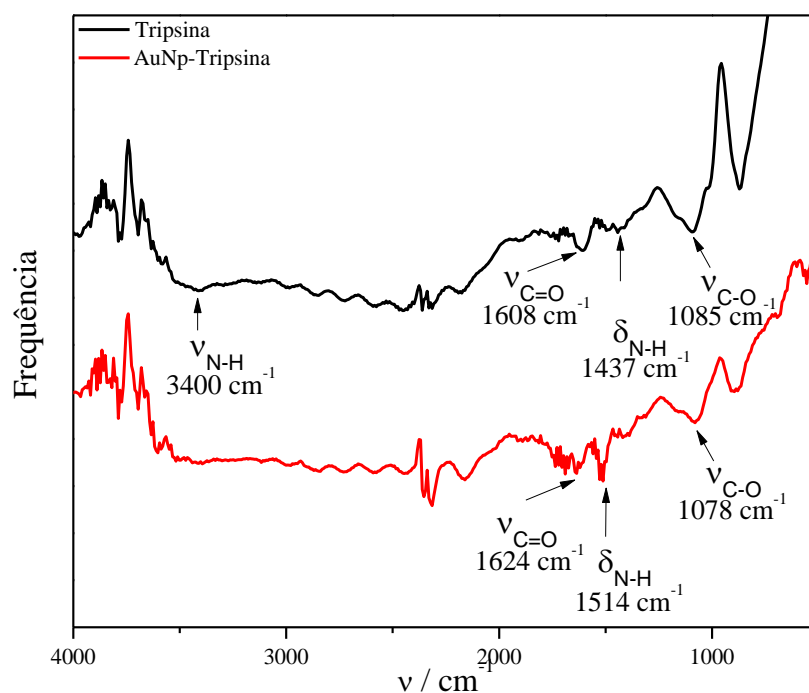
**Figura 12:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura.



#### **5.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) foi empregada para comprovar as interações entre a superfície da NpAu e a enzima Tripsina, conforme pode ser visto na Figura 13.

**Figura 13:** Espectros de FTIR para a Tripsina (linha preta) e NpAu-Tripsina (linha vermelha).



A Figura 13 apresenta os espectros na região do IR para a Tripsina (preto) e para o sistema bioconjugado NpAu -Tri (vermelho). É possível observar em ambos os espectros os principais modos vibracionais que caracterizam a Tripsina. Os picos em  $1608\text{ cm}^{-1}$ ,  $1437\text{ cm}^{-1}$  e  $1085\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídos, respectivamente ao estiramento C=O, deformação N-H e estiramento C-O, na Tripsina livre. Entretanto, para o sistema bioconjugado NpAu-Tri esses modos vibracionais deslocam-se, respectivamente para  $1624\text{ cm}^{-1}$ ,  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1078\text{ cm}^{-1}$ . Todos esses estiramentos encontram-se sumarizados na Tabela 3. Tais deslocamentos são indicativos de uma interação de natureza eletrostática entre a enzima Tripsina e a superfície do material, conforme também foi observado por Sun (2012) e Chanphai (2017) em outros estudos.

**Tabela 3:** Principais picos apresentados no espectro de FTIR.

| Vibração     | Tripsina              | NpAu-Tripsina         | Referência*                        |
|--------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|
| $\nu$ N-H    | $3400\text{ cm}^{-1}$ | ----                  | $3352\text{ cm}^{-1}$              |
| $\delta$ N-H | $1437\text{ cm}^{-1}$ | $1514\text{ cm}^{-1}$ | $1640\text{ cm}^{-1}$              |
| $\nu$ C=O    | $1608\text{ cm}^{-1}$ | $1624\text{ cm}^{-1}$ | $1540\text{-}1870\text{ cm}^{-1}$  |
| $\nu$ C-O    | $1085\text{ cm}^{-1}$ | $1078\text{ cm}^{-1}$ | $1000\text{ -}1260\text{ cm}^{-1}$ |

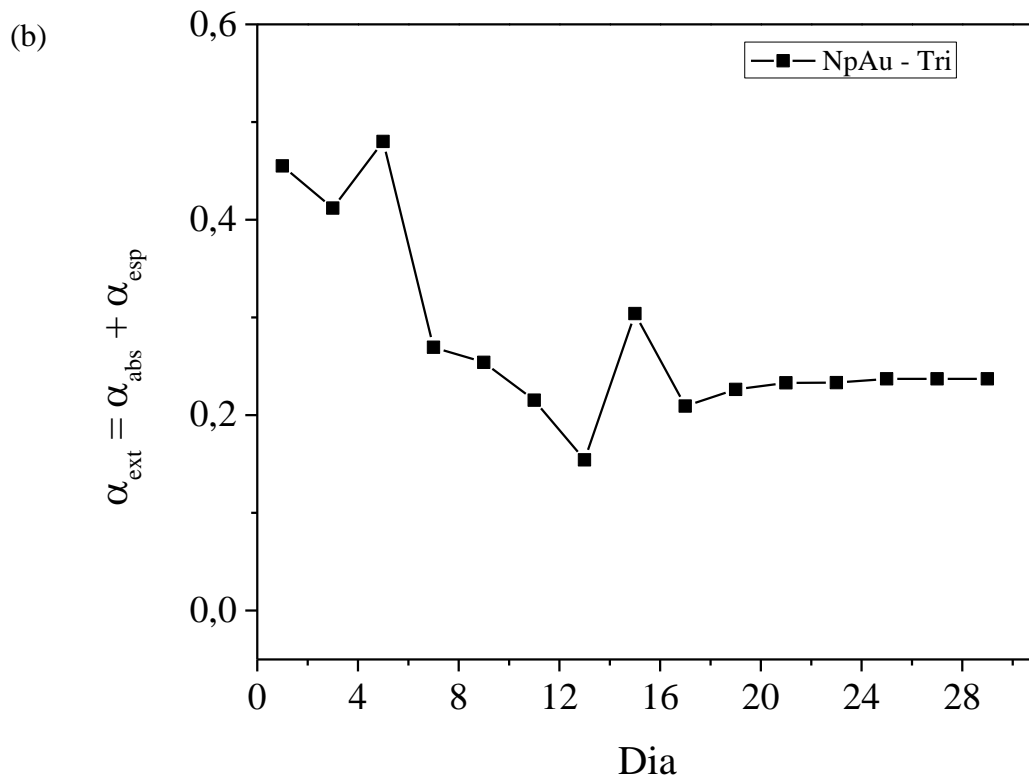
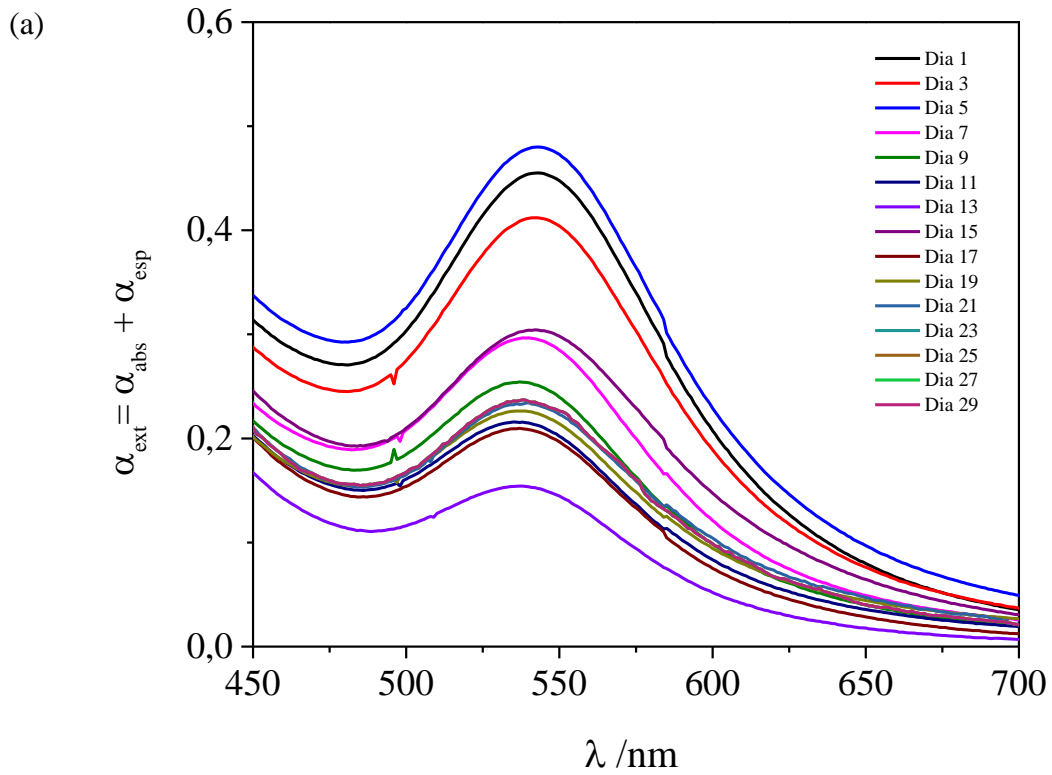
\*(COMPARATO FILHO et al. 2016; FORATO, 2010; PAVIA, 2010)

## 5.5 Estudo da estabilidade das NpAu-Tri

A estabilidade do sistema bioconjugado NpAu-Tri foi monitorada por espectroscopia na região do UV-Vis por um período de 29 dias com leituras realizadas com intervalos de 48 horas na região do espectro compreendida entre 300 a 800 nm. As soluções foram armazenadas sob refrigeração (10 °C) e protegidas da luz.

Na Figura 14 (a) é possível observar no espectro uma diminuição da absorbância entre o primeiro (linha preta) e o último dia (linha laranja). Essa diminuição reporta uma certa perda de estabilidade do sistema bioconjugado entre o primeiro dia (linha preta) e o último dia (linha vermelha). Esse efeito fica mais evidente quando se constrói um gráfico dos máximos de cada espectro em função dos dias em que a varredura foi realizada (Figura 14 b). Observa-se que há uma variação do primeiro dia até o décimo sexto dia e após isso percebe-se que a solução mantém a estabilidade, apresentando pouca oscilação da banda de absorção máxima. Isso pode indicar que o sistema atinge certa estabilidade a partir do décimo sexto dia da Síntese.

**Figura 14:** (a) Espectros de absorção na região do UV-vis para estudo de estabilidade e (b) gráfico da absorção máxima em função dos dias.



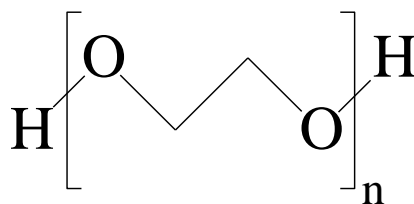
A perda de certa estabilidade antes do décimo sexto dia pode ser atribuída a mudanças sutis no meio e/ou mudanças bruscas que provocaram a agregação das Nps. Isso faz com que haja uma alteração na coloração da solução, indo de vermelho para roxo azulado. Esse fenômeno provocaria o deslocamento da BRPS para 650 nm (COMPARATO FILHO, et al. 2016). No entanto, as bandas variaram de 543 nm à 537 nm, corroborando com o aspecto visual, pois não houve alteração na coloração da solução. Entretanto, esse decaimento pode indicar que houve aglomeração das Nps ou o fenômeno de sinterização das Nanopartículas, nesse caso duas partículas se unem dando origem a uma maior não havendo o deslocamento da banda e sim o deslocamento do máximo de absorção e o alargamento da banda (BONIFÁCIO, 2006).

Alguns fatores externos, como a temperatura e agitação do sistema, podem contribuir para a aglomeração das Nps. A fim de se preservar a atividade enzimática da Tripsina, as soluções foram armazenadas sob refrigeração e no escuro, tais fatores podem ter influenciado na aglomeração das Nps e, portanto, no decaimento das absorvâncias, além do manuseio na hora da realização do experimento.

## **5.6 Síntese das NpAu-Tri – Método 2**

Nessa metodologia foram alterados alguns parâmetros visando melhorar a estabilidade do sistema. O  $\text{NaBH}_4$  foi usado em uma temperatura mais baixa que a ambiente, 17 °C. A diminuição da temperatura do agente redutor foi feita visando proteger a estrutura química da enzima Tripsina de modo a não afetar a sua atividade (BLANCO, 1989). Outro fator alterado foi a adição, durante a Síntese, do polietileno glicol (PEG), um polímero formado a partir do etileno glicol que possui alta afinidade com água, baixa toxicidade, biocompatibilidade e facilidade de excreção, podendo ser usado para adicionar estabilidade por meio de uma barreira estérica (ZHU, 2013), evitando com isso que houvesse uma agregação das Nps. A estrutura química do PEG está representada na Figura 15.

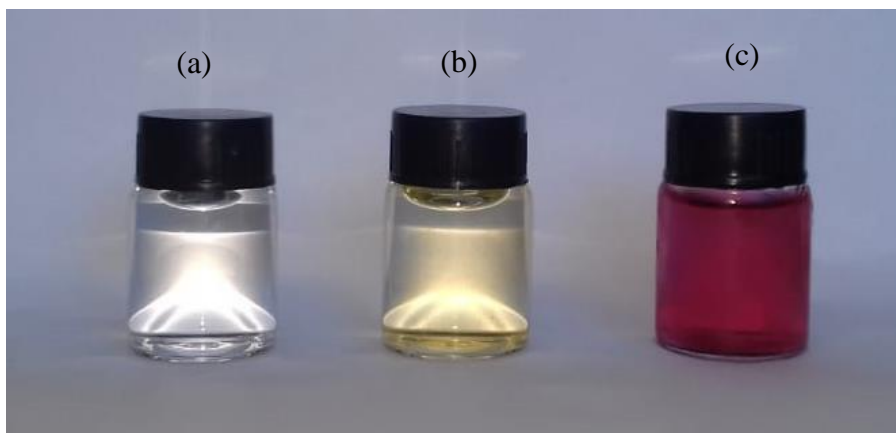
**Figura 15:** Estrutura química do Polietileno glicol (PEG).



Fonte: Próprio autor.

A Figura 16 mostra uma fotografia das soluções de Tripsina (a),  $\text{HAuCl}_4$  (b) e de  $\text{NpAu-PEG-Tri}$  (c). Claramente, é possível observar a mudança de coloração de um tom amarelo para um tom rosa, de maneira similar ao ocorrido na Síntese 1. Nessa Síntese, observa-se a coloração rosa mais intensa e uniforme do que a coloração rosa na Síntese 1. Isso é um indício de que a redução do ouro ocorreu e, portanto, de que as  $\text{NpAu-PEG-Tri}$  foram sintetizadas apresentando maior estabilidade.

**Figura 16:** Fotografia das soluções (a) de Tripsina; (b)  $\text{HAuCl}_4$ ; e (c)  $\text{NpAu-PEG-Tri}$ .

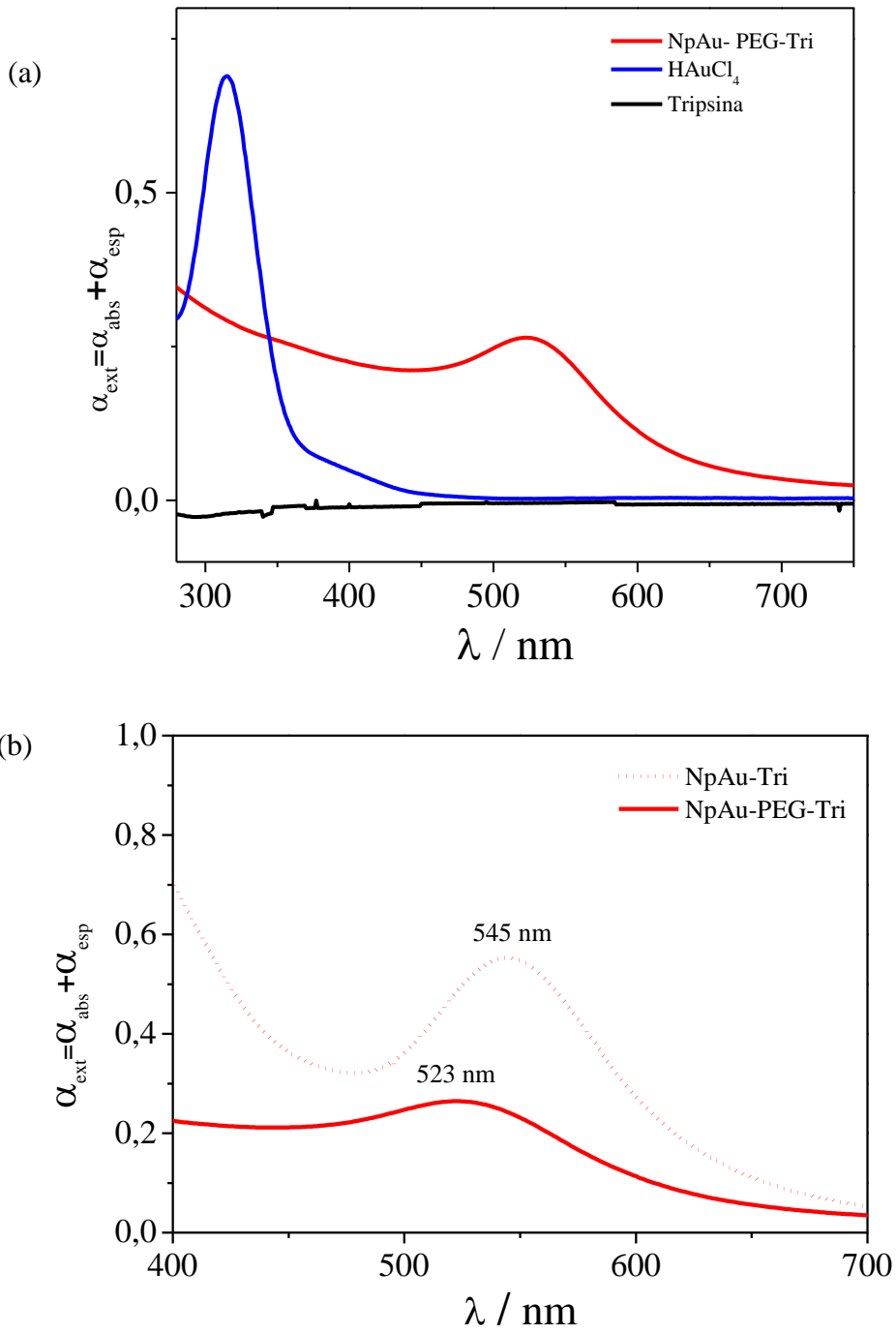


Fonte: Próprio autor.

## 5.7 Espectroscopia de absorção no UV-Vis

A Figura 17 (a) apresenta os espectros UV-Vis para a Tripsina (preto),  $\text{HAuCl}_4$  (azul) e para o biossistema  $\text{NpAu-PEG-Tri}$  (vermelho). A presença da banda de ressonância plasmônica de superfície com máximo de absorção na região de 523 nm indica que houve a formação das Nps. Assim como observado na Síntese realizada pelo método 1, o efeito do espalhamento da luz também pode ser observado a partir da elevação da linha de base típica da interação da luz com materiais que apresentem praticamente o mesmo comprimento de onda. Em relação à Síntese 1, que foi realizada sem a presença do polietilenoglicol, a intensidade do coeficiente de extinção ( $\alpha_{\text{ext}}$ ) está menor na Síntese 2, conforme pode ser visto na Figura 17 (b). Essa diferença pode ser atribuída a menor concentração do ácido áurico, em função da diluição ocorrida pela adição do volume de água proveniente da solução de PEG.

**Figura 17:** Espectros de absorção na região do UV-Vis para (a) Tripsina (preto),  $\text{HAuCl}_4$  (azul) e  $\text{NpAu-PEG-Tri}$  (vermelho). (b) Comparação entre os perfis espectroscópicos para  $\text{NpAu-Tri}$  (linha pontilhada) e  $\text{NpAu-PEG-Tri}$  (linha sólida).



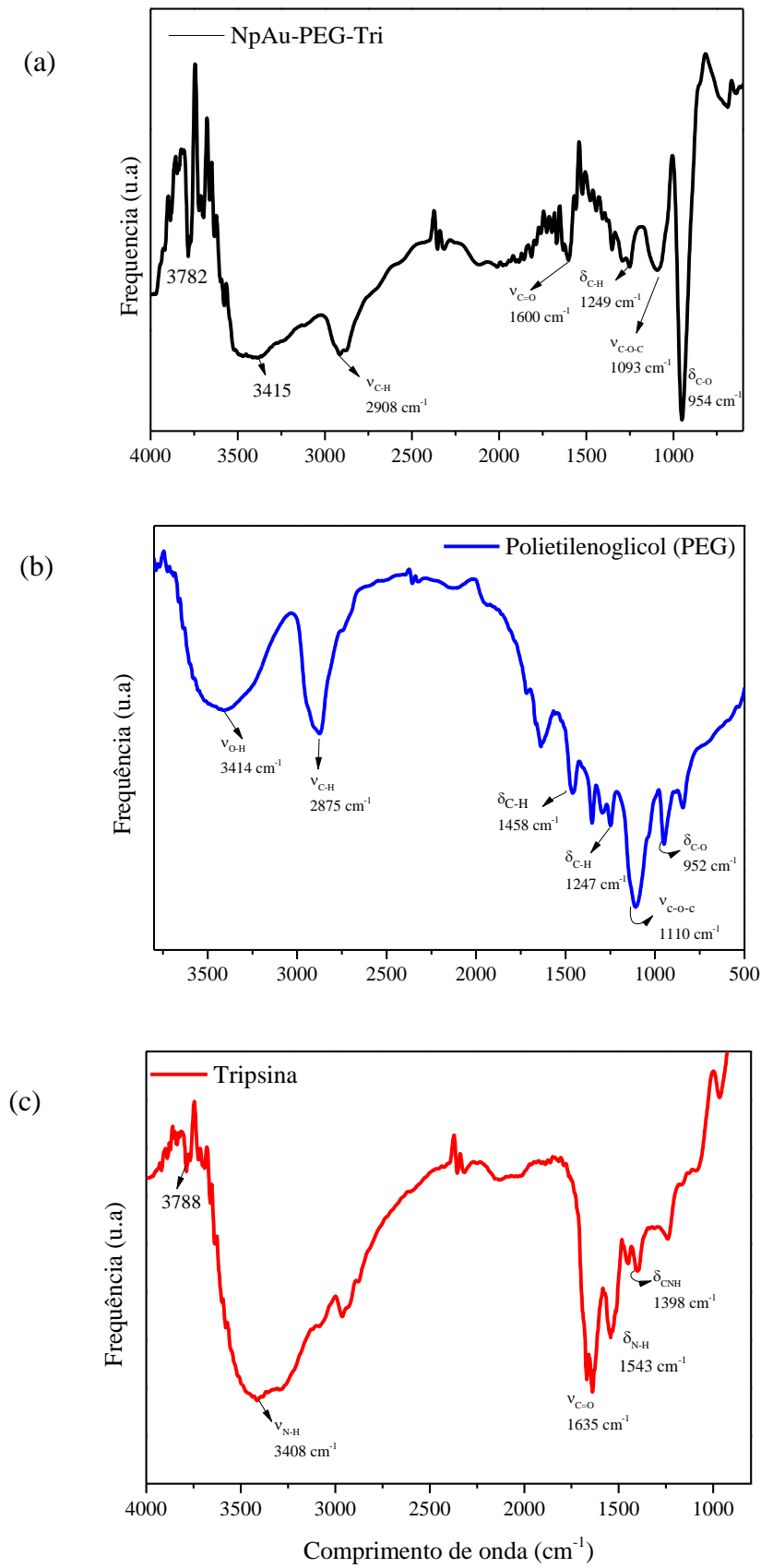
Fonte: Próprio autor.

## **5.8 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)**

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) desempenha um papel muito importante na identificação de materiais, através da análise das vibrações das ligações químicas de uma ampla gama de espécies e compostos moleculares. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem sido amplamente utilizada para a identificação de materiais químicos e biológicos, pois permite a caracterização rápida, não invasiva e altamente sensível de impressões digitais moleculares.

Com o propósito de investigar a natureza da interação entre as Nps, o PEG e a enzima Tripsina, realizou-se a análise, por meio da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Os espectros obtidos podem ser observados na Figura 18.

**Figura 18:** Espectros de FTIR para o sistema NpAu-PEG-Tri (a); Polietilenoglicol (b) e Tripsina (c).



A Tabela 4 sumariza os principais picos encontrados nas três amostras analisadas Tripsina, PEG e NpAu-PEG-Tri.

**Tabela 4:** Principais picos apresentados nos espectros de FTIR.

| Vibração       | Tripsina              | PEG                   | NpAu-PEG-Tri          | Referência*                |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|
| $\nu$ N-H      | 3408 $\text{cm}^{-1}$ | ----                  | ----                  | 3352 $\text{cm}^{-1}$      |
| $\delta$ N-H   | 1543 $\text{cm}^{-1}$ | ----                  | ----                  | 1560 $\text{cm}^{-1}$      |
| $\delta$ C-N-H | 1398 $\text{cm}^{-1}$ | ----                  | ----                  | 1300 $\text{cm}^{-1}$      |
| $\nu$ C=O      | 1635 $\text{cm}^{-1}$ | ----                  | 1600 $\text{cm}^{-1}$ | 1540-1870 $\text{cm}^{-1}$ |
| $\nu$ C-O      | ----                  | 1110 $\text{cm}^{-1}$ | 1093 $\text{cm}^{-1}$ | 1110 $\text{cm}^{-1}$      |
| $\nu$ O-H      | ----                  | 3414 $\text{cm}^{-1}$ | 3415 $\text{cm}^{-1}$ | 3400 $\text{cm}^{-1}$      |
| $\nu$ C-H      | ----                  | 2875 $\text{cm}^{-1}$ | 2908 $\text{cm}^{-1}$ | 2880 $\text{cm}^{-1}$      |
| $\delta$ C-O   | ----                  | 952 $\text{cm}^{-1}$  | 954 $\text{cm}^{-1}$  | 950 $\text{cm}^{-1}$       |

\*(COMPARATO FILHO et al., 2016; GUIMARÃES, 2018; DRUMOND, 2004; FORATO et al., 2010; PAVIA, 2010).

A Figura 18 apresenta os espectros na região do IV para o sistema bioconjugado NpAu-PEG-Tri (preto), o Polietilenoglicol (PEG) (azul) e para a Tripsina livre (vermelho). Pelos espectros é possível notar que as Nanopartículas interagiram com o PEG, devido a presença das bandas referentes ao PEG no espectro do sistema bioconjugado com deslocamentos das vibrações. As duas principais bandas características do PEG são o estiramento O-H, uma banda larga na região de 3400  $\text{cm}^{-1}$  associada as ligações de hidrogênio; e o estiramento assimétrico C-O na região de 1110  $\text{cm}^{-1}$ , e no espectro do sistema bioconjugado esses modos vibracionais sofreram deslocamentos (3415  $\text{cm}^{-1}$  e 1093  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente), o pico referente ao estiramento C-O ainda sofreu uma redução, mostrando que o polímero sofreu uma mudança na sua conformação estrutural.

Em relação à enzima Tripsina, o pico referente a sua estrutura que pode ser observado no espectro do sistema bioconjugado, é o referente ao estiramento C=O na região de 1635  $\text{cm}^{-1}$ , que sofreu um deslocamento para uma região de menor energia (1600  $\text{cm}^{-1}$ ). Tais deslocamentos são indicativos de mudanças estruturais na enzima e no polímero, e que sugerem interação destes com a superfície das Nanopartículas de natureza apenas eletrostática.

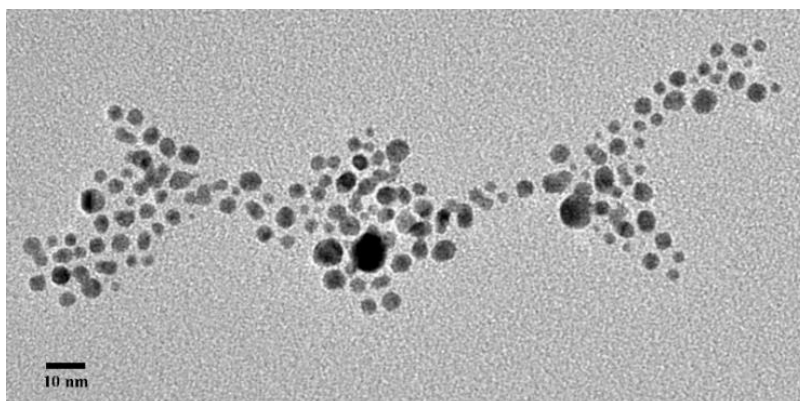
## 5.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise estrutural do biosistema NpAu-PEG-Tri foi realizada utilizando-se o MET com o propósito de se determinar o diâmetro e a forma. A Figura 19 (a) e (c) mostra que as Nanopartículas de ouro conjugadas ao PEG e a enzima Tripsina apresentam geometria esférica e que não houve presença considerável de aglomerados. O histograma de tamanho de partícula (Figura 19 (b) (d)), revela uma população de diâmetro médio de, aproximadamente, 4 nm representado pela curva Gaussiana, sendo que a maioria das Nps têm entre 3 e 4 nm de diâmetro.

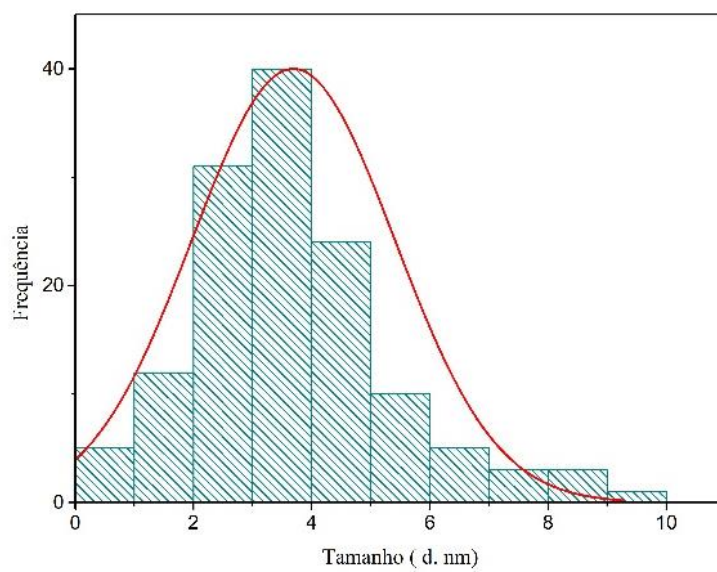
Um dos pontos que deve ser observado ao compararmos a metodologia de Síntese (1) com (2) é que nos dois casos as Nanopartículas geradas apresentaram diâmetros pequenos (5 e 4 nm, respectivamente), o que pode demonstrar a eficiência tanto da Tripsina como do PEG em atuar como agente de controle de crescimento das Nanopartículas.

**Figura 19:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das NpAu-PEG-Tri (a) e (c); Histogramas referentes às Nps (b) e (d).

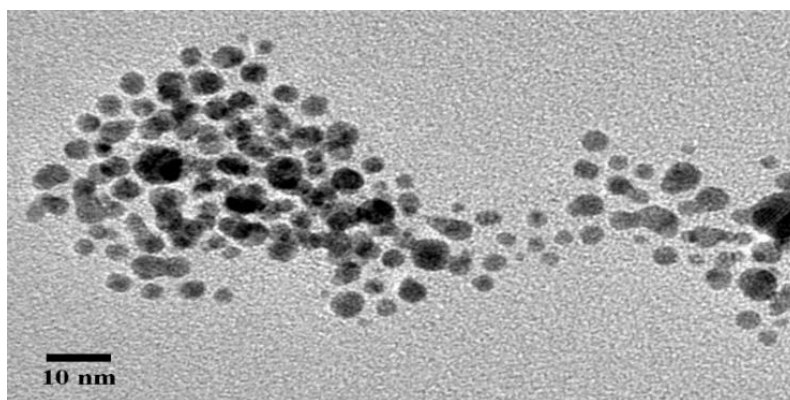
(a)



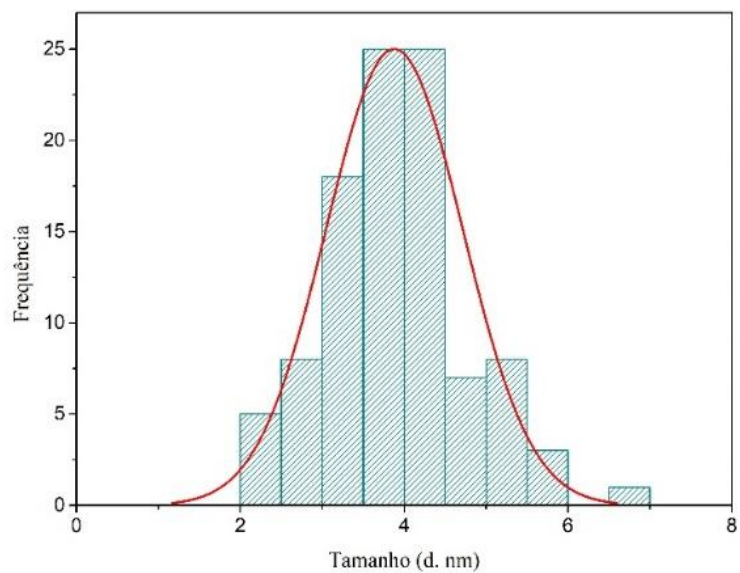
(b)



(c)



(d)

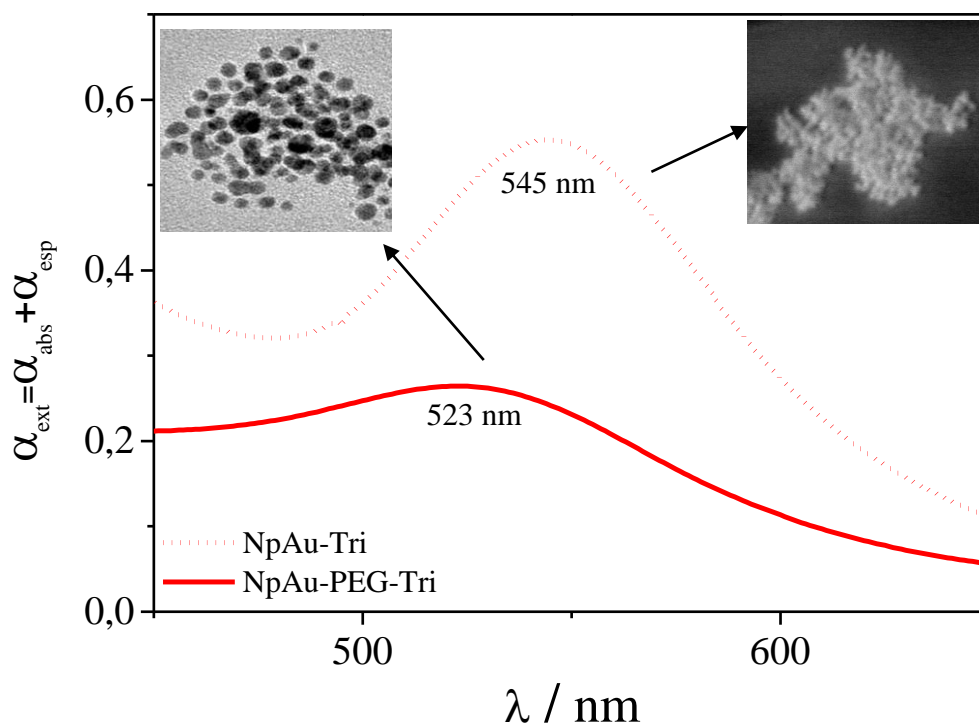


Outro fato que merece destaque é a posição da BRPS na comparação entre os perfis espectroscópicos dos dois biosistemas NpAu-Tri e NpAu-PEG-Tri, conforme visto na Figura 20. Nesta figura observa-se que a absorbância máxima para o sistema NpAu-Tri é de 545 nm, enquanto que para o sistema NpAu-PEG-Tri é de 523 nm. A relação existente entre o comprimento de onda ( $\lambda$ ) é inversamente proporcional a energia absorvida ( $E$ ) para gerar a BRPS, conforme a Equação 2. Onde  $E$  é a energia,  $h$  constante de Planck,  $c$  a velocidade da luz e  $\lambda$  o comprimento de onda.

$$E = h c / \lambda \quad \text{(Equação 2)}$$

Assim, fica evidente com a morfologia de cada sistema que na Síntese 1 as Nps necessitam de uma menor energia, levando o aparecimento da BRPS em 523 nm, diferentemente das Np da Síntese 2, as quais necessitam de uma maior energia. Isso ocorre porque as Nps na Síntese 2 são menores, mais isoladas e polidispersas, diferentemente das Nps na Síntese 1, as quais são maiores, mais agregadas e pouca polidispersão, conforme visualizado nos dois detalhes das microscopias inseridas dentro da Figura 20.

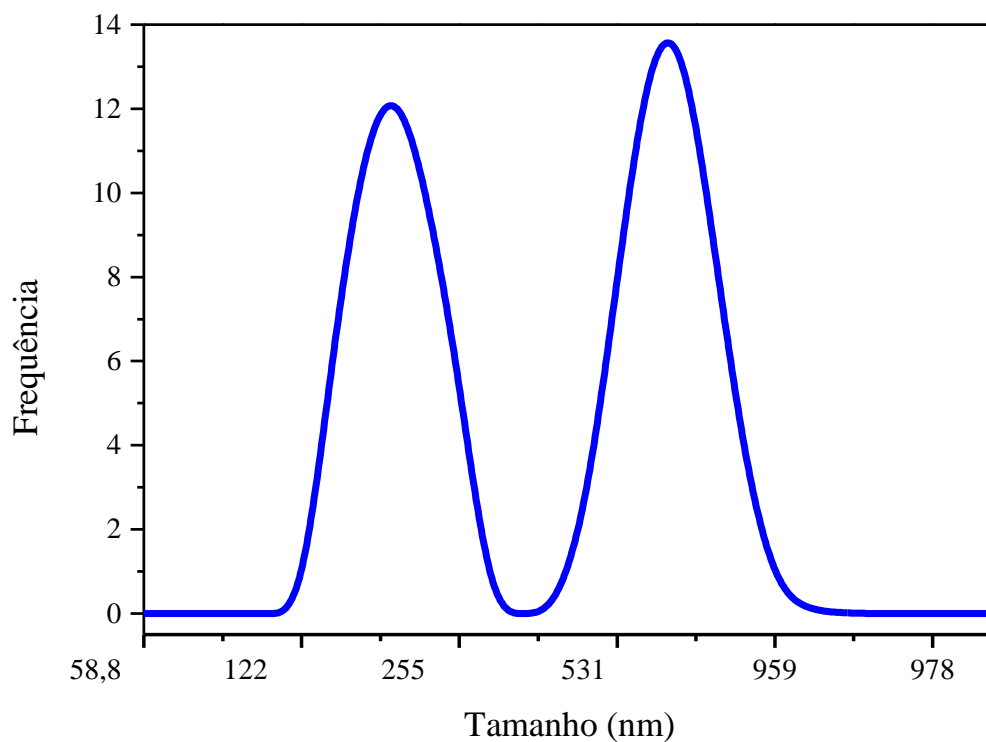
**Figura 20:** Espectros de absorção na região do UV-Vis correlacionando as características morfológicas com o posicionamento da BRPS em cada biosistema.



## 5.10 Espalhamento dinâmico da Luz (EDL)

O espalhamento dinâmico da luz é uma técnica de análise de tamanho de partícula baseada no movimento aleatório ou browniano de partículas em solução. A magnitude desse movimento é dependente do tamanho e forma da partícula que se encontra no meio. De modo que, partículas maiores se movem mais lentamente e dispersam mais luz do que as partículas menores. O diâmetro hidrodinâmico pode ser calculado a partir da dependência do tempo nas medições da intensidade de espalhamento e está representado na Figura 21.

**Figura 21:** Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico.



A análise por EDL das NpAu-PEG-Tri representada na Figura 21, avaliou o tamanho das partículas em dispersão aquosa. O diâmetro hidrodinâmico (DH) apresentou uma bimodal, com máximos em 164 nm e 615 nm, indicando a presença de duas populações de partículas. A presença de duas populações de Nanopartículas na solução pode indicar aglomeração de partículas ou/e que os agentes estabilizadores (PEG e Tripsina) se conjugaram a apenas umas parcelas das NpAu. Porém, é possível destacar que o EDL fornece uma estimativa simples e rápida do tamanho das partículas, entretanto, alguns estudos relatam limitações, como, por exemplo, a ineficácia em se

analisar a distribuição de partículas com perfil multimodal devido ao encobrimento de partículas menores por maiores, além de não ser capaz de discriminar Nps isoladas de agregadas (GHOSH et al. 2011; MARSON, 2019).

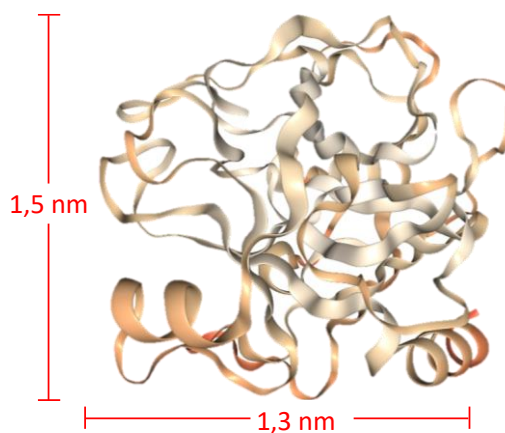
O índice de polidispersão (IP) foi de  $0,530 \pm 0,01$ . Esse índice é adimensional e basicamente descreve o grau de não uniformidade da distribuição das populações de tamanho dentro de uma determinada amostra. Valores abaixo de 0,05 são considerados altamente monodispersos e valores acima de 0,7 indicam que a amostra possui uma alta polidispersão sendo inadequada para análise por EDL. Sendo assim o biosistema NpAu-PEG-Tri se encontra dentro do limite aceitável (DANAEI et al. 2018).

O aumento do diâmetro nas análises por EDL pode ser atribuído a solvatação das Nanopartículas em meio aquoso via ligação de hidrogênio entre moléculas de água do meio e os terminais moleculares do PEG presentes na superfície das Nanopartículas. Além de que, o EDL mede o diâmetro hidrodinâmico de um grande número de partículas enquanto que o MET se baseia na medição que uma população limitada de Nanopartículas.

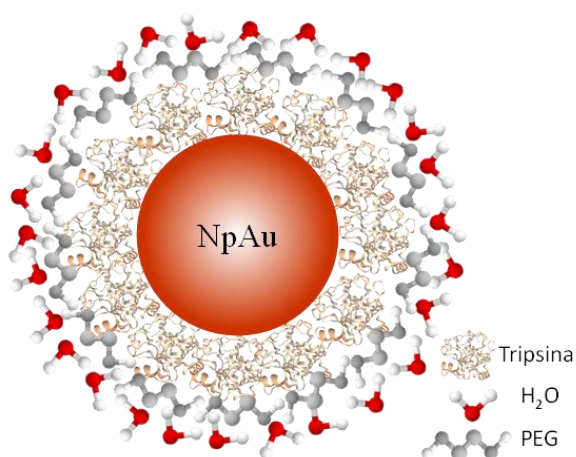
A fim de se propor um esquema de interação entre a Np e a enzima, realizou-se uma simulação computacional no site *Protein Data Bank* com a enzima Tripsina modelo 1H4A para obter informações acerca de suas dimensões. Assim, A Figura 22 (a) mostra que a enzima Tripsina apresenta uma geometria relativamente esférica com dimensões de 1,5 nm por 1,3 nm. Isso permite concluir que o diâmetro de uma Nanopartícula é praticamente o dobro do diâmetro da enzima, o que leva ao esquema proposto na Figura 22 (b), onde várias enzimas ficam na superfície da Np. No entanto, como a técnica de EDL detecta a somatória de Nps, PEG, Tripsina e moléculas de água, o raio hidrodinâmico visto no EDL consiste de uma macromolécula composta de inúmeros sistemas semelhante ao da Figura 22 (b) agrupados.

**Figura 22:** (a) Simulação computacional (site PDB) da enzima Tripsina. (b) Esquema proposto para o sistema NpAu-PEG-Tri.

(a)



(b)



Fonte: Próprio autor.

### 5.11 Potencial Zeta ( $\zeta$ )

O potencial Zeta é uma técnica usada para determinar a carga superficial de Nanopartículas em uma solução coloidal, e tem grande influência na interação de uma Np, sendo um preditivo da estabilidade da solução. Como referência tem-se que partículas com potencial zeta mais positivo que +30 mV ou mais negativo que -30 mV têm estabilidade coloidal mantida por repulsão eletrostática. Porém, assim como ocorre

no EDL, em amostras bimodais o valor de  $\zeta$  das partículas maiores domina o sinal (CHO et al. 2013; KUMAR; DIXIT, 2017).

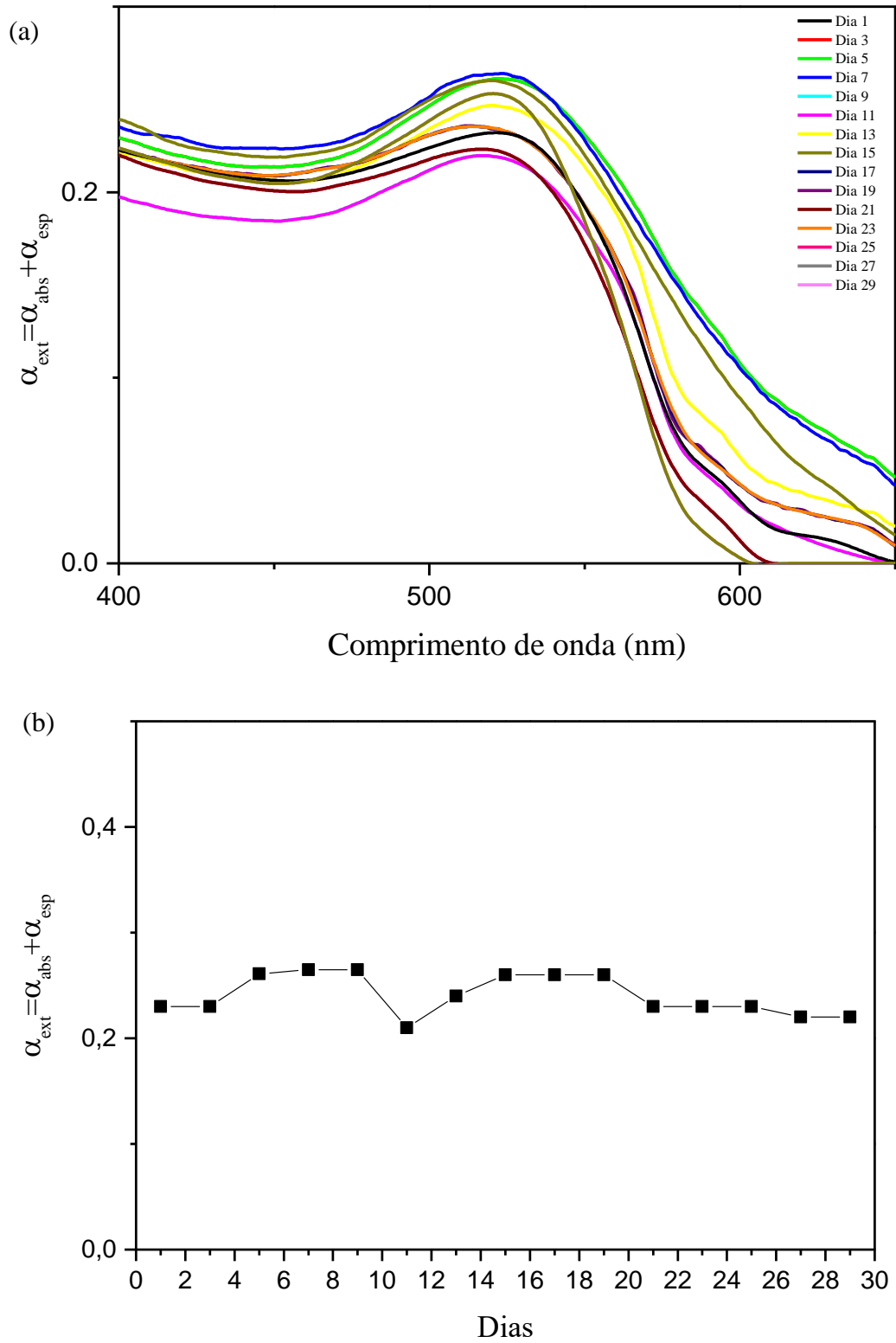
O Potencial- $\zeta$  foi de  $-12,19 \pm 0,03$  mV, esse valor indica que as nanopartículas estão carregadas negativamente e têm baixa estabilidade e podendo ser aglomerar, pois em dispersões com valores menores +25 mV ou maiores que -25 mV, ocasionalmente haverá aglomeração causada pela interação (Van der Waals, ligações de hidrogênio, etc.) entre as Nanopartículas visto que a repulsão eletrostática entrepartículas previne aglomeração. Entretanto, o teste de estabilidade de 30 dias mostrou que as NpAu-PEG-Tri mantiveram-se estáveis, o que indica que por determinado tempo a suspensão manteve sua estabilidade.

### **5.12 Estudo da estabilidade das NpAu-PEG-Tri**

O estudo de estabilidade é realizado com a finalidade de demonstrar como a solução se mantém com o passar dos dias. As análises foram realizadas com intervalo de 48 horas durante um período de 30 dias (15 leituras), em um espectrofotômetro na região do UV-Vis, conforme visto na Figura 23 (a). As amostras foram armazenadas na temperatura de 10 °C e protegidas da luz (embrulhadas em papel alumínio).

Os resultados obtidos foram satisfatórios, tendo em vista que conforme observado na Figura 23 (b) não houve grandes variações na absorção máxima. Tais resultados indicam que o sistema se mantém durante esse período de tempo.

**Figura 23:** (a) Espectros de absorção na região do UV-vis para estudo de estabilidade e (b) gráfico da absorção máxima em função dos dias.



## 6.0 CONCLUSÃO

A formação das Nanopartículas estabilizadas pela enzima Tripsina e pela Tripsina e PEG foi comprovada pela mudança na coloração da solução, típica do ouro em escala nanométrica e na análise por espectroscopia na região do UV-Vis com a presença da banda de ressonância plasmônica de superfície característica de Nanopartículas de ouro, portanto o processo de redução do ouro não é afetado pela presença da enzima e do polímero e a Síntese pode ser considerada eficaz.

Os resultados da espectroscopia de infravermelho (FTIR) comprovaram por meio de deslocamentos nos modos vibrações da enzima que, na Síntese realizada pela metodologia (I), houve interação entre a enzima e a superfície da Nanopartícula. Na Síntese realizada pela metodologia (II) observou-se que a superfície da enzima foi preenchida com o PEG, porém, no sistema biconjugado em si houve a presença de apenas uma banda característica da enzima, a sobreposição das bandas pode ter contribuído para isso.

As imagens obtidas por MEV e MET apresentaram Nanopartículas esféricas com diâmetros abaixo de 10 nm e sem grandes aglomerações. Entretanto, o EDL obtido para as Nps sintetizadas pela metodologia (II) mostrou que em solução o diâmetro das partículas tem um aumento de até 155 vezes o tamanho original, esse comportamento pode ter sido provocado pela interação do PEG com a água. O potencial zeta e o índice de polidispersão mostraram que o sistema tende a se aglomerar.

O teste de estabilidade mostrou decaimento nas absorções máximas das bandas características da formação de Nanopartículas com o passar dos dias no caso das Nps na ausência do PEG, porém as bandas se mantiveram no mesmo comprimento de onda demonstrando que o sistema manteve certa estabilidade. Com base nos testes de estabilidade das duas Sínteses realizadas, pode-se observar que a Síntese realizada na presença do PEG manteve-se mais estável, elucidando que embora a Tripsina tenha um potencial estabilizante, este pode ser otimizado.

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, K. B. A.; SUBRAMANIAN, S.; SIVASUBRAMANIAN, A.; VEERAPPAN, G.; VEERAPPAN, A. Preparation of gold nanoparticles using *Salicornia brachiata* plant extract and evaluation of catalytic and antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v.130, p. 54-58, set. 2014.

AI, K.; LIU, Y.; LU, L. Hydrogen-bonding recognition-induced color change of gold nanoparticles for visual detection of melamine in raw milk and infant formula. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 131, p. 9496-7, jul. 2009.

AVVAKUMOVA, S. Gold Nanoconjugates: Preparation, Characterisation and Biological Applications. Tese (doutorado). **Università degli Studi di Milano Scuola di Dottorato in Chimica Industriale**. Milão, Itália. Jan. 2012.

BARUAH, B.; MILLER, T. Polyoxovanadate fabricated gold nanoparticles: Application in SERS. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v.487, p.209-216, fev. 2017.

BALLOTTIN, D.P.M. **Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecidos antimicrobianos**. (Tese de Doutorado). Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2014.

BERG, J. M. TYMOCZKO J. L.; STRYER L.; GATTO, G. J. **Bioquímica**. 7<sup>o</sup> edição – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

BLANCO, R.M.; GUISÁN, J. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reductions of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 11 (6), p. 360-366, 1989.

BONIFÁCIO, Leonardo da Silva. **Processos de agregação e fusão de Nanopartículas de ouro: Uma abordagem química**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BRANDALISE, M. **Preparação e caracterização de eletrocatalisadores PtRu/C, PtBi/C, PtRuBi/C para eletro-oxidação direta de etanol em células a combustível tipo PEM utilizando metodologia da redução via borohidreto de sódio**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BROWN D. M.; DICKSON, C.; DUNCAN, P.; FURAT AL-ATTILI, A.; STONE V. Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality. **Nanotechnology**, [s.l.], v. 21, abr. 2010.

CHANPHAI, P.; KREPLAK, L.; TAJMIR-RIahi, H.A. Aggregation of trypsin and trypsin inhibitor by Al cation. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, [s.l.], v.169, p.7-12, abril 2017.

CHANPHAI, P.; TAJMIR-RIahi, H.A. Trypsin and trypsin inhibitor bind PAMAM nanoparticles: Effect of hydrophobicity on protein–polymer conjugation. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 461, p. 419-424, jan. 2016.

CHAVEZ, L.; YIZARD, C. **Efeito dos inibidores de proteases benzamidinas nas respostas bioquímico-fisiológicas de Coffea arabica e da cochonilha Coccus viridis**. 2016. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2016.

CHEN, H.; ZHOU, K.; ZHAO, G. Gold nanoparticles: From synthesis, properties to their potential application as colorimetric sensors in food safety screening. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 78, p. 83-94, ago. 2018.

CHO, E. J. et al. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093-2110, 2013.

COMPARATO FILHO, O.; CÂNDIDO, M. A.; LEMES G.M.; RANIERO, L. J. Influência da concentração de oligonucleotídeos no efeito de aglomeração de Nanopartículas na presença de solução salina. **Revista UniVap**. [s.l.], v.22, n.39 p. 126-132, 2016.

CRESPILHO, F. N. **Membranas eletroativas nanoestruturadas: Estudo de transporte de carga e imobilização enzimática**. 2007. Tese (doutorado em ciências), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2007.

CUI, C.; LIU, T.; CHEN, T.; LU, J.; CASAREN, I.; LIMA, D. B.; CARVALHO, P.C.; BEUVE, A.; LI, H. Comprehensive identification of protein disulfide bonds with pepsin/trypsin digestion, Orbitrap HCD and Spectrum Identification Machine. **Journal of Proteomics**, [s.l.], v. 198, p.78-86, abr. 2019.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, [s.l.], v.10 (2), 2018.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**, [s.l.], v. 61 (5), mai. 2009.

DOLES, T; BOZIC, S; GRADISAR, H; JERALA, R. Functional self-assembling polypeptide bionanomaterials. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 40, p. 629-634, aug. 2012.

DRUMOND, WALKER S; WANG, SHU HUI; MOTHE, CHEILA G. Síntese e caracterização do copolímero poli (ácido láctico-b-glicol etilênico). **Polímeros**, [s.l.], v. 14 (2), p. 74-79, jun. 2004.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 363(1), p.1-24, nov. 2011.

DVORAK, J.; HORN, M. Serine proteases in schistosomes and other trematodes. **International Journal for Parasitology**, [s.l.], v. 48, n. 5, p. 333-344, abr. 2018.

DYKMAN, L.A; KHLEBTSOV, N. G. **Gold nanoparticles in biomedical applications**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2018. 353 p. ISBN 9780203711507 (ebook).

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, [s.l.], v.184, p. 537-556, jul. 2018.

FREESTONE, I.; MEEKS, N.; SAX, M.; HIGGITT, C. The lycurgus cup - a roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 270–277, 2007.

FORATO, LUCIMARA APARECIDA. **A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010. 14 p. – (Embrapa Instrumentação. Documentos 51, ISSN 1518-7179; 51).

GHOSH, D., SARKAR, D., GIRIGOSWAMI, A., & CHATTOPADHYAY, N. A Fully Standardized Method of Synthesis of Gold Nanoparticles of Desired Dimension in the Range 15 nm–60 nm. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s.l.], v. 11(2), p. 1141–1146, 2011.

GOPINATH, K.; VENKATESH, K.S.; ILANGO VAN, R.; SANKARANARAYANAN, K.; ARUMUGAM, A. Green synthesis of gold nanoparticles from leaf extract of Terminalia arjuna, for the enhanced mitotic cell division and pollen germination activity. **Industrial Crops & Products**, [s.l.] v. 50, p. 737-742, out. 2013.

GU, L.; YAN, W.; LIU, S.; REN, W.; LYU, M.; WANG, S. Trypsin enhances aptamer screening: A novel method for targeting proteins. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v.561-562, p. 89-95, nov. 2018.

GUIMARÃES, Paulo Celso Leventi. **Síntese e caracterização de Nanopartículas de PEG adsorvidas com glicina (Gly@PEG/NPs) para aplicação biotecnológica: um estudo in vitro**. 2018. 109 f., il. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

HINTERWIRTH, H.; LINDNER, W.; LÄMMERHOFER, M. Bioconjugation of trypsin onto gold nanoparticles: Effect of surface chemistry on bioactivity. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 733, p. 90-97, jul. 2012.

HIROSE, A. L. S. **Estudo da extração de Tripsina em sistemas de duas fases aquosas numa microcoluna**. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP: [s.n.], 2001.

HRKACH, J.; VON HOFF, D.; MUKKARAM ALI, M., et al.; Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. **Science translational medicine**, [s.l.], v. 4 (128), p.128-139, abr. 2012.

HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, [s.l.], v.1 (1), p.13-28, 2010.

HUNTER, R. J. **Charge and Potential Distribution at Interfaces. Zeta Potential in Colloid Science - Principles and Applications**. 3ª edição. Londres: Academic Press Limited, 1988.

HYEONIL K.; HAN S. K.; DABIN L.; DONGWON S.; DAEHO S.; JEONGKWON K.; JUNGBAE K. Microwave-Assisted Protein Digestion in a Plate Well for Facile Sampling and Rapid Digestion. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 89 n. 20, p.10655 (6), out. 2017.

IBARRA-GARCÍA, L.E.; MAZÓN-SUÁSTEGUI, J.M.; ROSAS, C.; TOVAR-RAMÍREZ, D.; BÁRCENAS-PAZOS, G.; CIVERA-CERECEDO, R.; CAMPA-CÓRDOVA, A.I. Morphological and physiological changes of Octopus bimaculoides: From embryo to juvenile. **Aquaculture**, [s.l.], v. 497, p. 364-372, dez. 2018.

IONESCU, R.E.; FILLIT, C.; JAFFREZIC - RENAULT, N.; COSNIER, S. Urease-gelatin interdigitated microelectrodes for the conductometric determination of protease activity. **Biosensors and Bioelectronics**, [s.l.], v. 24 (3), p.489 (4), nov. 2008.

KUMAR, A., & DIXIT, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**, p. 43–58. doi:10.1016/b978-0-08-100557-6.00003-1, 2017.

LIU, L.; XIA, N.; LIU, H.; KANG, X.; LIU, X.; XUE, C.; HE, X. Highly sensitive and label-free electrochemical detection of microRNAs based on triple signal amplification of multifunctional gold nanoparticles, enzymes and redox-cycling reaction. **Biosensors and Bioelectronics**, [s.l.], v. 53, p. 399, mar. 2014.

LIZZI, A.; CARNICELLI, V.; CLARKSON, M.; NAZZICONE, C.; SEGATORE, B.; CELENZA, G.; ASCHI, M.; DOLO, V.; STROM, R.; AMICOSANTE, G. Bovine lactoferrin and its tryptic peptides: Antibacterial

activity against different species. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 4, p. 435-440, 2016.

LORBER, B.; FISCHER, F.; BAILLY, M.; ROY, H.; KERN, D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, [s.l.], v. 40, n. 6, p. 372-382, nov. 2012.

LOUIS, C.; PLUCHERY, O. **Gold Nanoparticles For Physics, Chemistry and Biology**. França: World Scientific, 2012. 396 p. ISBN 978-1-84816-806-0

LUKIANOVA-HLEB, E.; KIM, Y.; BELATSARKOUSKI, I.; ILLENWATER, A.; O'NEILL, B. Intraoperative diagnostics and elimination of residual microtumours with plasmonic nanobubbles. **Nature Nanotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 6, p. 525-532, jun. 2016.

MARSON, B. M. **Síntese de copolímeros biodegradáveis PLA-b-PEG e PLA-b-PEG folato e desenvolvimento de micro e Nanopartículas poliméricas contendo álcool perílico**. Tese (doutorado). Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2019.

MARTINS, M. V. A.; BONFIM, C.; DA SILVA, W. C.; CRESPILO, F. N. Iron (III) nanocomposites for enzyme-less biomimetic cathode: A promising material for use in biofuel cells. **Electrochemistry Communications**, [s.l.], v.12, ed.11, p.1509-1512, 2010.

MARTINS, G.; FERNÁNDEZ-LODEIRO, J.; DJAFARI, J.; LODEIRO, C.; CAPELO, J.L.; SANTOS, H. M. Label-free protein quantification after ultrafast digestion of complex proteomes using ultrasonic energy and immobilized-trypsin magnetic nanoparticles. **Talanta**, [s.l.], v. 196 p. 262-270, mai. 2019.

MENDES, M. S. S. **Métodos “verdes” de produção de nanomateriais que promovem nanotecnologias sustentáveis**. 2015 (dissertação). Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Lisboa, Portugal, 2015

MIAO, P.; LIU, T.; LI, X.; NING, L.; YIN, J.; HAN, K. Highly sensitive, label-free colorimetric assay of trypsin using silver nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, [s.l.], v. 49, p. 20 (5), nov. 2013.

MU, QX.; JIANG, GB.; CHEN, LX.; ZHOU, HY.; FOURCHES, D.; TROPSHA, A.; YAN, B. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 114 (15), p. 7740-7781, ago. 2014.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. **Química Nova**, [s.l.], v. 37 (2), p. 308-316, abr. 2014.

NAIMI-SHAMEL, N.; POURALI, P.; DOLATABADI, S. Green synthesis of gold nanoparticles using *Fusarium oxysporum* and antibacterial activity of its

tetracycline conjugan. **Journal de mycologie medicale**, [s.l.], v.29, ed. 1, p.7-13, abril 2019.

NEELY, L.A ; AUDEH, M. ; PHUNG, N. A.; MIN, M.; SUCHOCKI, A.; PLOURDE, D.; BLANCO, M.; DEMAS, V.; SKEWIS, L.R.; ANAGNOSTOU, T.; COLEMAN, J.J.; WELLMAN, P.; MYLONAKIS, E.; LOWERY, T. J. T2 magnetic resonance enables nanoparticle-mediated rapid detection of candidemia in whole blood. **Science translational medicine**, 24 April 2013, Vol.5(182), pp.182ra54

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6<sup>a</sup> Edição Porto Alegre, Artmed, 2014.

PATRNOGIC, J. Serine proteases and serine protease homologs: genetic analysis of their involvement in immune response activation in *Drosophila*. (tese). **University of Strasbourg**. França, 2014.

PAVIA, D.L. et al., **Introdução à Espectroscopia**, 4<sup>a</sup> Edição. Cengage Learning, 2010.

RCSB. **Native Bovine Pancreatic Trypsin**. Disponível em: <http://www.rcsb.org/3d-view/1S0Q/1>. Acesso em: 20 abril 2019.

SALAR S.; MEHRNEJAD F.; SAJEDI R. H.; AROUGH, J. M. Chitosan nanoparticles-trypsin interactions: Bio-physicochemical and molecular dynamics simulation studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 103, p. 902–909, out. 2017.

SANTOS, J. F. L., *et al.* Localized surface plasmon resonance applied to biosensors and solar cells. **Quimica Nova**, [s.l.], v. 39, n. 9, p. 1098-1111, 2016.

SATO, D.; KONDO, T.; KATO, T. Dual emissive bispyrene peptide probes for highly sensitive measurements of trypsin activity and evaluation of trypsin inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v.26, n. 12, p. 3468-3473, jul. 2018.

SHEN, Y.; GUAN, Y.; YAO, S. Supercritical fluid assisted production of micrometric powders of the labile trypsin and chitosan/trypsin composite microparticles. **International Journal of pharmaceuticals**, [s.l.], v.489 (1-2), p.226-236, jul. 2015.

SIMPSON, B.; NUNNERY, G.; TANNENBAUM, R.; KALAITZIDOU, K. Capture/release ability of thermo-responsive polymer particles. **Journal of Materials Chemistry**, [s.l.], v. 20, ed. 17, p 3496-3501, mai. 2010.

SUN, J.; MA, H.; LIU Y.; Su Y.; XIA, W; YANG, Y. Improved preparation of immobilized trypsin on superparamagnetic nanoparticles decorated with metal ions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 414, p. 190-197, nov. 2012.

SUNDARAMURTHY, J.; DHARMARAJAN, R.; SRINIVASAN, M.P. Fabrication of molecular hybrid films of gold nanoparticle and polythiophene by covalent assembly. **Thin Solid Films**, [s.l.], v.589, p. 238-246, ago. 2015.

SIRITAPETAWE, J.; LIMPHIRAT, W.; NANTAPONG, N.; SONGTHAMWAT, D. Fabrication of silver chloride nanoparticles using a plant serine protease in combination with photoactivation and investigation of their biological activities. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s.l.], v. 65 (4), p. 572-579, jul. 2018.

SHAMSIPUR, M.; FARZIN, L.; TABRIZI, M. Ultrasensitive aptamer-based on-off assay for lysozyme using a glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles and electrochemically reduced graphene oxide. **Microchimica Acta**, [s.l.], v. 183 (10), p. 2733-2743, abr. 2016.

TIWARI, A. D.; MISHRA, A. K.; MISHRA, S. B.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Green synthesis and stabilization of gold nanoparticles in chemically modified chitosan matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 48, ed. 4, p.682-687, mai. 2011.

TURCI, F.; GHIBAUDI, E.; COLONNA, M.; BOSCOLO, B.; FENOGLIO, I.; FUBINI, B. An integrated approach to the study of the interaction between proteins and nanoparticles. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, [s.l.], v. 26 (11), p. 8336-8346, jun. 2010.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, [s.l.], v. 11, p. 55-75. 1951.

VIEIRA, D. M. P. V. **Estudos cinéticos em reacções de hidrólise enzimática de proteínas acelerada por ultrasons**. Dissertação. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal, 2008.

VIEIRA, L. S. **Síntese e caracterização de Nanopartículas de ouro encapadas com prata**. 2012. Dissertação (graduação). Faculdade de engenharia arquitetura e urbanismo, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, 2012.

WU, Z.; LIU, Y.; LIU, Y.; XIAO, H.; SHEN, A.; ZHOU, X.; HU, J. A simple and universal “turn-on” detection platform for proteases based on surface enhanced Raman scattering (SERS). **Biosensors and Bioelectronics**, [s.l.], v. 65, p. 375-381, mar. 2015.

YU, H.; REGULACIO, M. D.; YE, E.; HAN, M. Chemical routes to top-down nanofabrication. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42 (14), p. 6006-6018, 2013.

YUN, C. S. Towards Serine Protease Inhibitors. 2013. 275 f. Tese (Doutorado) - **The University of Queensland - Institute for Molecular Bioscience**, Austrália, 2013.

ZHU, L.; WANG, T.; PERCHE, F.; TAIGIND, A.; TORCHILIN, V. P. Enhanced anticancer activity of nanopreparation containing an MMP2-sensitive PEG-drug conjugate and cell-penetrating moiety. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, [s.l], v. 110(42), p. 17047-17052, out. 2013.