

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

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA TRIPSINA E NANOPARTÍCULAS DE  
PRATA

JOSÉ GUILHERME MARTINS SIQUEIRA

Catalão - GO

2021



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

José Guilherme Martins Siqueira

#### 3. Título do trabalho

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA TRIPSINA E NANOPARTÍCULAS DE PRATA.

#### 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:

- consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- 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.



Documento assinado eletronicamente por **Jocélia Pereira De Carvalho Oliveira**, Professora do Magistério Superior, em 31/05/2021, às 16:54, 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 **JOSÉ GUILHERME MARTINS SIQUEIRA**, Usuário Externo, em 31/05/2021, às 18:03, 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 2103316 e o código CRC EC4F8E52.

Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão  
Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA TRIPSINA E NANOPARTÍCULAS DE  
PRATA

**José Guilherme Martins Siqueira**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal de Goiás – Regional  
Catalão como requisito para obtenção do título de mestre.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira**

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

Área de concentração: Química.

Catalão - GO

2021

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

Siqueira, José Guilherme Martins  
ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA TRIPSINA E  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA [manuscrito] / José Guilherme  
Martins Siqueira. - 2021.  
74 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, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2021.

Bibliografia.

Inclui siglas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. nanomaterial. 2. biofuncionalização. 3. nanobiocomposto. 4. protease. 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 09 da sessão de Defesa de Dissertação de José Guilherme Martins Siqueira, 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 abril de dois mil e vinte e um, a partir da(s) 14:00 horas, por videoconferência, na sala virtual: <https://meet.google.com/tdy-tgdt-oty>, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA TRIPSINA E NANOPARTÍCULAS DE PRATA.” na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira (UAEQ/UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Welter Cantanhêde da Silva (UFPI), membro titular externo; Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa (UAEQ/UFG-RC), membro titular interno cujas participações ocorreram por meio de videoconferência. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestões de pequenas alterações e complementações no trabalho final. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o(a) candidato(a) **aprovado(a)** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora 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.

#### TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Não houve alteração no título



Documento assinado eletronicamente por **Jocélia Pereira De Carvalho Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 21/05/2021, às 13:09, 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 **Lorena Ramos Freitas De Sousa, Professor do Magistério Superior**, em 21/05/2021, às 13:16, 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 **WELTER CANTANHEDE DA SILVA, Usuário Externo**, em 21/05/2021, às 13:19, 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 **2084782** e o código CRC **F4C997A2**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço pela vida e as oportunidades que apareceram pelo meu caminho, pela minha primeira professora que motivou a vontade de aprender e transmitir esse conhecimento;

A minha mãe Maria que sempre esteve ao meu lado me amparando e sendo meu porto seguro no meu crescimento pessoal;

Aos meus irmãos Aline, Rafael e José Mar que de alguma forma estiveram comigo o tempo todo e me ajudando;

Aos meus orientadores Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira, Marccus Victor Alemida Martins e Frank Nelson Crespilho, pelo direcionamento, discussões, sugestões, conversas, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Frank Nelson Crespilho, por me receber em seu grupo e me disponibilizar toda a infraestrutura que seu laboratório e o Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) oferece;

Agradeço em especial a Jocélia pela amizade e todo suporte emocional, por sempre querer meu melhor de todas as formas possíveis;

As minhas melhores amigas Nathália e Tainara, pela amizade fortalecida na graduação, nos grupos de laboratório, que mesmo a distância sempre foram minhas companheiras, com as palavras de incentivo e acolhimento;

Ao Romário, não menos amigo que as meninas, sempre presente na minha vida, nunca me deixou de lado e sempre me dando ótimos conselhos;

Ao Iago de Assis Modenez, que me deu suporte no laboratório, auxiliando nos experimentos e nas discussões, sendo um companheiro nas horas ruins e boas, sempre me divertindo com seu bom humor;

A Leidiane minha colega de pós-graduação pelos momentos de convivência no Laboratório Multidisciplinar de nanomateriais e todos os colegas da Universidade Federal de Catalão;

Aos meus companheiros de laboratório Giovana e Natália, juntamente com o Iago, foram aqueles que durante este período, estiveram mais próximos de mim. Durante o período que estive na USP, tornando esse período ainda mais agradável;

Aos meus companheiros do grupo Bioeletroquímica e Interfaces: Ayaz, Bruno, Daniel, Gabriel, Graziela, Isabela, João Carlos, José Eduardo, Luana, Lucyano, Thiago;

Aos amigos que dividiram apartamento e me suportaram nos períodos difíceis, Murillo e Thiago, mas que ficávamos juntos ao assistir series, com o vínculo criado para aguentar a saudade da família;

Ao Laboratório Multidisciplinar de nanomateriais e todos os colegas da Universidade Federal de Catalão;

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) pela infraestrutura necessária para a realização deste trabalho;

A Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) e seus técnicos pelo auxílio em análises e experimentos de caracterização dos materiais;

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida;

As professoras Lorena Ramos Freitas de Sousa e Maria Rita de Cássia Santos, pelas contribuições a este trabalho durante o exame de qualificação do mestrado.

## RESUMO

O estudo sobre interações entre biomoléculas e nanomateriais é uma interface da química/nanociência que surge para compreender o comportamento dos materiais na presença de diversas biomoléculas, uma vez que podem entrar em contato com fluidos biológicos, o estudo de como interagem esses nanomateriais e biomoléculas tornam-se uma tarefa importante. As enzimas apresentam papel fundamental para o metabolismo e seu desequilíbrio pode levar ao surgimento ou agravamento de doenças. A enzima tripsina, é utilizada a mais de cinco décadas pela importância fisiológica, por participar do processo digestivo, de coagulação do sangue e fertilização. Dentro deste contexto, esse trabalho objetivou estudar como ocorre a interação entre a enzima tripsina e nanopartículas de prata em meio aquoso. Foram sintetizadas nanopartículas de prata através do método de co-redução química, as quais apresentaram a banda plasmônica com absorção máxima em 407 nm, posteriormente ao ser adicionado tripsina para adsorção, o que ocasionou deslocamento para o vermelho. Através da espectroscopia na região do infravermelho, pode-se confirmar a presença dos principais modos vibracionais antes e após a formação do nanobiocomposto. As nanopartículas sintetizadas apresentaram um formato esférico. Outros estudos revelaram que, após a interação, há uma diminuição do potencial zeta e conseqüente aumento do raio hidrodinâmico, essas mudanças das características afetaram a estrutura secundária da proteína, causando perda de organização e formação de um complexo nanopartícula-enzima mais hidrofóbico, pelas interações eletrostáticas e de ligação de hidrogênio.

## ABSTRACT

The study on interactions between biomolecules and nanomaterials is a chemistry/nanoscience interface that emerges to understand the behavior of materials in relation of several biomolecules, since this materials interact with biologic fluids, the study of how these nanomaterials and biomolecules interactions happen became an important task. Enzymes play a fundamental role in metabolism and their imbalance can lead to the onset or worsening of diseases. The enzyme trypsin is the most used enzyme for over five decades due to its physiological importance, as it participates in the digestive process, blood clotting and fertilization. In this context, this work aimed to study how the interaction between the enzyme trypsin and silver nanoparticles occurs in aqueous medium. Silver nanoparticles were synthesized using the chemical co-reduction method, which presented the plasmonic band with maximum absorption at 407 nm, after the addition of trypsin for adsorption, which caused a shift to the color red. Through spectroscopy in the infrared region, the presence of the main vibrational modes can be confirmed before and after the formation of the nanobiocomposite. Morphologically, the synthesized nanoparticles had a spherical shape. Other studies revealed that, after the interaction, there is a zeta potential decrease and a consequent increase in the hydrodynamic radius, these changes in the characteristics affected the secondary structure of the protein, causing loss of organization and formation of a more hydrophobic nanoparticle-enzyme complex, due to the interactions electrostatic and hydrogen bonding.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>Ag<sup>+</sup></b>	Cátion prata
<b>Ag<sup>0</sup></b>	Prata no estado fundamental
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de prata
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
<b>C</b>	Carbono
<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub></b>	Citrato de sódio
<b>CaF<sub>2</sub></b>	Fluoreto de cálcio
<b>DC</b>	Dicroísmo Circular
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
<b>EDL</b>	Espalhamento dinâmica de luz
<b>EDS</b>	Espectroscopia de Energia Dispersiva
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>FPA</b>	Matriz de plano focal
<b>FTIR</b>	Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>Glu</b>	Ácido Glutâmico
<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monopotássio
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão

<b>NPM</b>	Nanopartícula metálica
<b>N</b>	Nitrogênio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sódio dibásico
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	Borohidreto de sódio
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NPsAg</b>	Nanopartículas de prata
<b>NPsAg/Tri</b>	Tripsina adsorvida nanopartícula de prata
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PEG</b>	Polietileno glicol
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SEIRA</b>	Espectroscopia de absorção no infravermelho intensificada por superfície, do inglês <i>Surface enhanced infrared absorption spectroscopy</i> .
<b>Ser</b>	Serina
<b>His</b>	Histidina
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>SPR</b>	Ressonância de Superfície Plasmônica, do inglês <i>surface plasmon resonance</i>
<b>STNPs</b>	Nanoplacas triangulares de prata, do inglês <i>Silver triangular nanoplates</i>
<b>Tri</b>	Tripsina
<b>TRI</b>	Tirosina

<b>TRP</b>	Triptofano
<b>TSC</b>	Citrato Trissódico, do inglês <i>trisodium citrate</i>
<b>UCNP</b>	Nanopartículas de conversão ascendente, do inglês <i>upconversion nanoparticles</i>
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta na região do visível
<b>Val</b>	Valina
<b><math>\Delta G</math></b>	Energia livre de Gibbs
<b><math>\zeta</math></b>	Potencial Zeta
<b><math>E^0</math></b>	Potenciais padrão de redução

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Equipamentos utilizados nos experimentos.....	31
<b>Tabela 02</b> . Lista de materiais e reagentes.....	31
<b>Tabela 03</b> . Classificação de estabilidade de coloides segundo o potencial Zeta.....	38
<b>Tabela 04</b> . Estrutura secundária da proteína por FTIR.....	61
<b>Tabela 05</b> . Estrutura secundária para tripsina por DC.....	63

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Método de Turkervich, redução química do ácido cloroáurico por citrato de sódio para formação de nanopartículas de ouro com pequena faixa de distribuição de tamanho..... 20
- Figura 02.** Síntese química, por redução química com borohidreto de sódio (a) e síntese biológica por meio de catalise enzimática (b)..... 21
- Figura 03.** Origem de um dipolo induzido e movimentação da nuvem eletrônica no espectro visível para a NPsAg..... 22
- Figura 04.** Catalise enzimática para serino proteases..... 24
- Figura 05.** Sequência de resíduos de aminoácidos para tripsina de pâncreas bovino..... 25
- Figura 06.** Estrutura tridimensional do campo eletrostático da enzima tripsina, contendo 16 resíduos positivos (regiões azuis) e 10 resíduos negativos (regiões vermelhas) e sítio específico ligado a íon metálico cálcio (verde) ..... 26
- Figura 07.** Possíveis interações da nanopartículas em meio biológico..... 27
- Figura 08.** Imagem do processo de síntese de NPsAg pelo método de co-redução química por  $\text{NaBH}_4$  e TSC, e controle de tamanho pelo pH..... 41
- Figura 09:** Imagem da solução coloidal de NPsAg obtida após processo de síntese..... 42
- Figura 10.** Espectro de UV-Vis para  $\text{AgNO}_3$ , em preto; Citrato trissódico, em verde;  $\text{NaBH}_4$ , em vermelho; NaOH em laranja e NPsAg em azul (a); Espectro da solução coloidal de NPsAg (b)..... 43
- Figura 11.** Espectro de UV-Vis para  $\text{AgNO}_3$  nas concentrações de 2, 3, 4, 5 e 6 nm (a); gráfico de ABS *versus* concentração de  $\text{AgNO}_3$  (b)..... 44
- Figura 12.** Espectro de UV-Vis para NPsAg digeridas em ácido nítrico..... 45

<b>Figura 13.</b> Espectro de UV-Vis para NPsAg durante 30 dias (a) e gráfico da absorbância <i>versus</i> dia (b).....	46
<b>Figura 14.</b> Imagem das soluções de tripsina $2 \cdot 10^{-2}$ mg/mL (a), 0,1 nmol/L NPsAg (b) e NPsAg/Tri (c).....	47
<b>Figura 15.</b> Espectro de UV-Vis para solução de $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L tripsina adsorvida por 24 horas em 4°C em 0,1 nmol/L NPsAg em tampão PBS 5 mmol/L (linha vermelha) e 0,1 nmol/L de NPsAg em tampão PBS 5 mmol/L (linha azul) (a), Estrutura tridimensional da enzima com resíduos de aminoácidos responsáveis por absorção em 280 nm.....	48
<b>Figura 16.</b> Dimensões da tripsina pelo modelo 1H4A.....	49
<b>Figura 17.</b> Distribuição de raio hidrodinâmico para NPsAg em azul, Tripsina em preto e NPsAg/Tri em vermelho, 50 mg/L em PBS 5 mmol/L, pH 7,4.....	50
<b>Figura 18.</b> Imagem das NPsAg/Tri (solução laranja) e NPsAg (solução amarela). Raios hidrodinâmicos para NPsAg/Tri, NPsAg e tripsina.....	50
<b>Figura 19.</b> Potencial zeta para NPsAg (em preto) e AgPs/Tri em vermelho.....	51
<b>Figura 20.</b> Imagem das NPsAg/Tri com corpo de fundo a esquerda e NPsAg a direita pela mudança de Potencial Zeta.....	52
<b>Figura 21.</b> Histograma das NPsAg e imagem de MET (a), Imagem com maior ampliação de MET para NPsAg (b).....	53
<b>Figura 22.</b> EDS para NPsAg sem a presença da enzima.....	54
<b>Figura 23.</b> Imagem de MET de NPsAg/Tri (a), (b) e (c).....	54
<b>Figura 24.</b> EDS para NPsAg/Tri.....	55
<b>Figura 25.</b> Espectro de infravermelho por transformada de Fourier para Citrato trissódico (2mmol/L), linha preta e NPsAg estabilizada por Citrato (0,5 nmol/L), linha vermelha. As intensidades foram normalizadas para melhor comparação.....	56

**Figura 26.** Espectro de infravermelho por transformada de Fourier para enzima Tripsina, (a) na região de  $3800\text{ cm}^{-1}$  a  $900\text{ cm}^{-1}$  e (b) na região de  $1800\text{ cm}^{-1}$  a  $900\text{ cm}^{-1}$  ..... 57

**Figura 27.** Espectro de infravermelho por transformada de Fourier para enzima Tripsina  $1.10^{-5}$  mol/L, em preto, NPsAg/Tri, em, vermelho..... 58

**Figura 28.** Imagem de microscopia para NPsAg (a), Tri (b) e NPsAg/Tri (c), mapa químico de superfície Tri (b.1) e NPsAg/Tri (c.1) esquema de *coffe ring* (d)..... 59

**Figura 29.** Estrutura secundária da tripsina,  $\alpha$ -Hélice em laranja, Folha- $\beta$  em verde e Random coil em roxo. Deconvolução de Amida I para a enzima tripsina, (a) para a região de mapa químico b, (b) região de mapa químico d..... 61

**Figura 30.** Espectro de dicroísmo circular a  $25^{\circ}\text{C}$  para tripsina  $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$  e NPsAg  $1.0 \times 10^{-10}$  mol  $\text{L}^{-1}$  em tampão PBS 5 mmol/L, pH 7.4..... 62

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 Nanopartículas de Prata .....	20
1.2 Proteases.....	24
1.3 Tripsina .....	26
1.4 Biofuncionalização de Nanopartículas.....	28
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
2.1 Objetivo Geral .....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 Equipamentos .....	32
3.2 Materiais.....	32
3.3 Procedimento experimental.....	33
3.3.1 Síntese das NPsAg.....	33
3.4 Técnicas de caracterização:.....	33
3.4.1 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível – UV-Vis.....	33
3.4.2 Estimativa de concentração de Ag e NPsAg.....	36
3.4.3 Dicroísmo Circular - DC.....	36
3.4.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho - FTIR.....	37
3.4.5 Espalhamento dinâmico de luz - EDL .....	37
3.4.6 Microespectroscopia-FTIR ( $\mu$ -FTIR) .....	37
3.4.7 Potencial Zeta ( $\zeta$ ).....	38
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
4.1 Síntese, caracterização e quantificação das NPsAg.....	40
4.2 Interação entre NPsAg e Tri por UV-Vis. ....	48
4.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) e Potencial Zeta ( $\zeta$ ) .....	49
4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	53
4.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho e Microscopia Óptica .....	57
4.6 Dicroísmo Circular .....	63
<b>5 Conclusões .....</b>	<b>65</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um ramo da pesquisa que vem integrando diferentes áreas da ciência e da tecnologia, acentuando o potencial para inovação industrial, como por exemplo, no setor médico (SHARMA et al., 2016). Essa integração se dá devido ao nanomaterial apresentar propriedades físico-químicas melhoradas quando comparadas aos seus respectivos materiais em escalas convencionais. Especificamente, características únicas tais como pequeno tamanho, composição elementar, reatividade e principalmente por sua morfologia e elevada área superficial possibilitam um nanomaterial ter um elevado potencial de aplicabilidade (MA et al., 2010).

Devido a esse melhoramento das propriedades físico-químicas o estudo da ciência como fenômenos que se processam na escala do nanômetro tem despertado o interesse de inúmeros trabalhos (DURAN et al., 2006). O aumento da investigação de produtos nanotecnológicos em diversas áreas baseia-se na capacidade de manipulação de átomos, moléculas ou íons em nanoescala, o que permite o aperfeiçoamento de sistemas maiores. Com isso, por exemplo, alguns nanomateriais podem desempenhar a função de nanocatalisadores em diversas reações químicas e bioquímicas com elevado rendimento (GEONMONOND et al., 2018).

Dentre os nanomateriais, as nanopartículas metálicas (NPM) destacam-se, devido principalmente a sua fácil obtenção. Esses nanomateriais são considerados como uma suspensão coloidal, também podendo ser denominada “micro heterogêneo”, como uma forma adequada para grande parte destas soluções, uma vez que apresentam dimensões entre o intervalo de 1 nm a 1  $\mu$ m, (SIGNORI et al., 2010).

Ao se falar em obtenção, nanopartículas são termodinamicamente instáveis e tendem a se agregar e crescer espontaneamente. Por isso, um dos maiores desafios na síntese de nanopartículas (NPs) está na formação e permanência destes nanomateriais de forma estáveis e dispersos, de modo ao seu tamanho quão em relação ao formato (JEEVANANDAM et al., 2018).

Esse controle no processo de formação do nanomaterial é importante, pois garante a estabilidade do sistema. Desta forma, dependendo da aplicação, os materiais nanoestruturados carecem da capacidade de se conservarem estáveis por períodos de tempo extensos, sem que ocorra alteração de suas propriedades, ou deformações de sua estrutura. A procura por outros métodos para a síntese ou funcionalização destinados a aumentar a estabilidade química das NPs tem se tornado elemento de estudo para diversos pesquisadores (KHAN et al., 2017).

NPs de metais nobres, como ouro, prata e platina, têm mostrado relevância por possuírem propriedades químicas e físicas que diferem profundamente das propriedades dos simples aglomerados (FRATTINI et al., 2005; LU et al., 2007). Por exemplo, a prata no seu estado elementar, na escala nano (NPsAg – nanopartículas de prata) ou em aglomerados é tecnologicamente importante, pois apresenta propriedades que são relacionadas à atividade catalítica, condutividade, efeitos antibacterianos, aos quais podem ser controladas pelo tamanho das NPs e por seu formato (IRAVANI et al., 2019;). Dentre todos os nanomateriais, as NPsAg são as que apresentam o maior nível de comercialização tendo mais de 50% da representação do total do consumo de nanomateriais (DURÁNA et al., 2019).

Durante o processo de síntese das NPs uma grande variedade de moléculas pode ser empregada como agentes estabilizadores, disponibilizando uma plataforma multifuncional para direcionamento de fármacos, técnicas de diagnóstico, que corrobora seu potencial em ensaios clínicos. Uma demonstração dos dispositivos de detecção baseados em nanomateriais pode ser bem demonstrado pelo biossensor com maior sucesso em diagnósticos clínicos, os biossensores de glicose. Com distintos nanomateriais e nanopartículas de diferentes metais, misturas e seus óxidos (ARNOLD et al., 2005; KANNAN et al., 2014; ROY et al., 2015; THORLEY et al., 2013; UNMÜSSIG et al., 2018).

Nanopartículas funcionalizadas com moléculas específicas, como DNA, RNA, anticorpos ou proteínas podem direcionar o reconhecimento ao modular a farmacocinética e aumentar a eficácia de drogas anti-infecciosas. Ao serem funcionalizadas, em certos tipos de nanopartículas, ocorre o surgimento de características ideais para aplicação em análises diagnósticas, proporcionando a capacidade de miniaturização, facilitando alguns métodos clássicos de detecção de patógenos. Várias técnicas de imobilização de bioreceptor, imobilização de biomoléculas, foram propostas para a fabricação de biossensores, baseadas na deposição assistida por eletroquímica, ligação covalente com polipeptídeos, encapsulamento e até mesmo abrangendo adsorção física simples (método *drop casting*) (HOWES et al., 2014; WANG et al., 2017; WU et al. 2019).

Sendo muito aplicadas no setor da saúde, há a possibilidade de exposição a fluidos biológicos, estando vulneráveis a uma infinidade de proteínas. As NPsAg podem ser espontaneamente estabilizadas com proteínas, devido a interações química de diversos tipos, dando origem a proteína ‘corona’ (BARBALINARDO et al., 2018). Esse termo é empregado quando nanomateriais são expostos às biomoléculas, geralmente proteínas, formando uma camada. Este sistema pode alterar o estado de agregação, tamanho, e as propriedades

interfaciais das NPsAg, mudando a identidade biológica de sua identidade sintética. Dessa forma, isso leva a determinação da reatividade e funcionalidade de NPsAg para destino de estudos *in vivo* (LI et al., 2018; WALKEY et al., 2014; ZANGANEH et al., 2016). Assim, há um grande potencial em estudar a interação entre NPsAg e proteínas, como as enzimas, o que deve facilitar a concepção dos efeitos biológicos e a aplicação segura em *in vivo*.

Na literatura, as NPsAg correspondem a um dos nanomateriais mais estudados atualmente. Isso é devido ao elevado potencial de aplicação na indústria e comércio, graças às suas propriedades como reatividade, elevada condutividade elétrica e térmica, atividade catalítica, relativo baixo custo de produção e principalmente potente ação antimicrobiana frente a bactérias, vírus, fungos e protozoários (JEEVANANDAM et al., 2018). Dessa forma, as NPsAg são amplamente utilizadas em várias aplicações como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios, antitumorais, regeneradores, biossensores e catalisadores. Elas estão presentes em produtos na indústria de alimentos, têxtil, perfumaria, farmacêutica, agrícola, higiene, produtos de limpeza, tintas, eletroeletrônicos, entre outras (DURÁN et al., 2011). Com o uso crescente das NPsAg, é consequente e correspondente a liberação no ambiente. Alguns estudos relataram que as NPsAg são facilmente liberadas dos produtos que os contêm, como roupas e tintas de paredes externas, essa liberação de prata na forma de nanopartículas pode variar de 34 a 80% (ZHANG et al., 2018).

## **1.2 Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata**

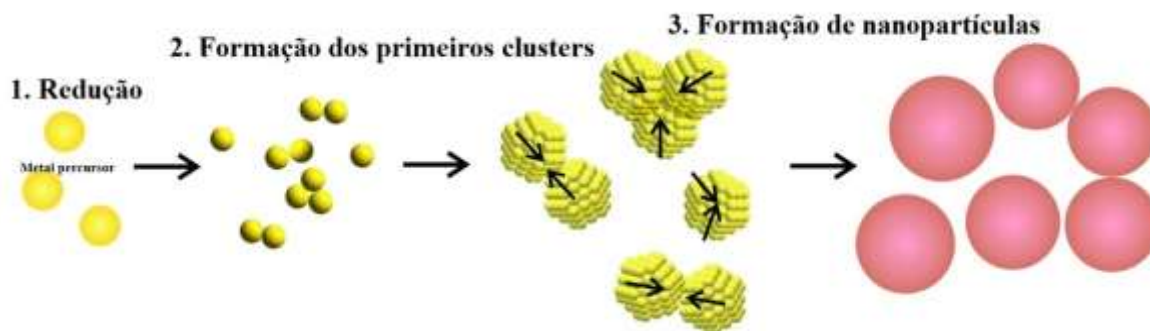
Há várias concepções conforme o emprego do uso dos termos nanopartículas e nanotecnologia segundo as agências envolvidas com nanotecnologia e nanopartículas. A mais atual recomendação segundo a Comunidade Europeia define que um nanomaterial é: *“um material natural, incidental ou manufaturado contendo partículas, em estado não agregado ou agregado, no qual 50% ou mais das partículas na distribuição de tamanho numérico, uma ou mais dimensões externas estiverem na faixa de tamanho 1 nm - 100 nm”* (DURÁN, N. et al., 2019).

Em 1928, a prata na forma coloidal era o material mais utilizado para tratamento de doenças e infecções antes da descoberta da penicilina (VARNER, 2010). A prata é um material importante, que na maioria das vezes é empregada em tamanho nanométrico.

O método de Turkervich (Figura 01) utiliza de ácido cloroáurico e citrato de sódio em baixa concentração em meio aquoso aquecido até ebulição, gerando nanopartículas de ouro esféricas e com pequena faixa de distribuição, com tamanho médio de 20 nm. Esta síntese por

método químico, mais tarde foi utilizado para a síntese de NPsAg. Neste caso, observa-se uma distribuição de tamanho mais amplo – entre 60 nm e 200 nm – contudo, tem-se a vantagem do citrato atuando tanto como agente redutor dos íons prata quanto como agente estabilizante (PACIONI et al., 2015).

**Figura 01.** Método de Turkervich, redução química do ácido cloroáurico por citrato de sódio para formação de nanopartículas de ouro com pequena faixa de distribuição de tamanho.

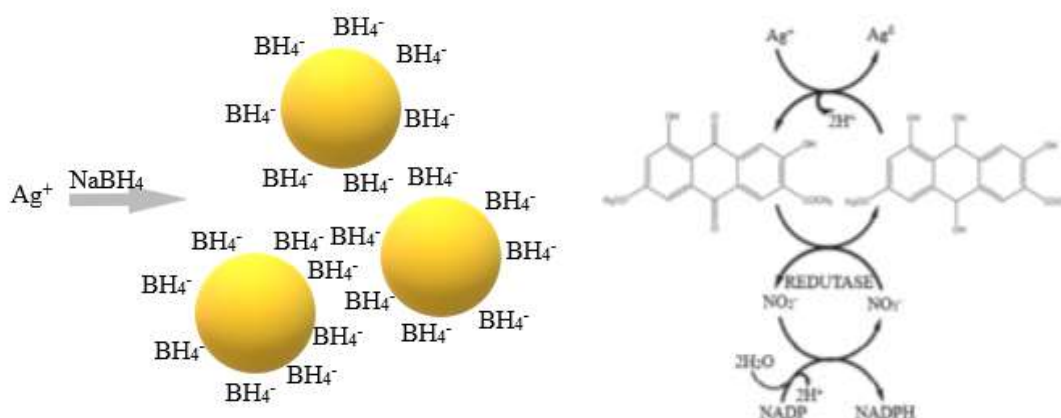


Fonte: adaptado de POLTE, J. 2015.

Outros métodos também são aplicados para a formação e controle morfológico de NPsAg, como métodos térmicos. Normalmente essas sínteses, são rápidas, porém geram NPs polidispersas, promovendo uma ampla faixa de tamanho das partículas, necessitando de altas temperaturas e agentes redutores fortes. Também há sínteses fotoquímicas para a síntese de nanopartículas de prata (LEE et al., 2019).

Além disso, síntese por redução química é a mais tradicional e empregada, há outras diversas metodologias de síntese de nanopartículas de prata, uma delas é a síntese biológica ou biogênica, que vem se destacando em desenvolvimentos recentemente devido a sua rapidez, simplicidade e sustentabilidade, conforme Figura 02, entretanto uma dificuldade enfrentada por esse método é o controle de tamanho e morfologia (DURÁN et al., 2018).

**Figura 02.** Síntese química, por redução química com borohidreto de sódio (a) e síntese biológica por meio de catálise enzimática (b).



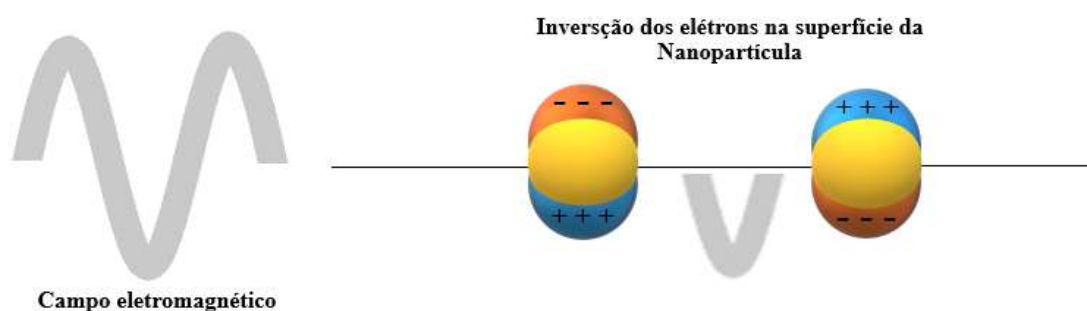
Fonte: adaptado de MULFINGER, L. 2007.

Como foco de estudos recentes o tema de síntese, Michna e colaboradores (2019) na produção de nanopartículas prata, pesquisaram a formação de nanopartículas de prata modificado em mica monocamada, em cloreto de polidialildimetilamônio, com estabilizantes do “metodo verde”, como sacarose e glicose, não tóxicos, e obtiveram suspensões estáveis.

Nos métodos químicos os valores dos potenciais padrão de redução ( $E^0$ ) indicam quais reagentes apropriados para que a mudança no estado de oxidação da espécie de interesse ocorra de forma suficiente, possuindo uma energia livre de Gibbs negativa ( $\Delta G < 0$ ) e o  $\Delta E^0$  positivo ( $\Delta E^0 > 0$ ). É necessário uso de redutores fortes uma vez que o potencial de redução da prata em meio aquoso é relativamente alto ( $Ag^+ \rightarrow Ag^0$ ,  $E^0 = + 0,799V$ ). Os valores para os agentes redutores, borohidreto de sódio ( $NaBH_4$ ,  $E^0 = - 0,481V$ ) e citrato de sódio ( $C_6H_5Na_3O_7$ ,  $E^0 = - 0,180 V$ ) (LESK, 2017).

A velocidade de redução afeta o tamanho e a forma, o que pode ser observado pelo comportamento óptico já que é para nanomaterial metálico. Apresentando absorção inerente na região do espectro visível, denominado de banda plasmon, ou ressonância plasmônica de superfície (*surface plasmon resonance – SPR*), isso ocorre pela movimentação coletiva na superfície da nanopartícula ocasionada pela excitação da energia eletromagnética fornecida (LEE et al., 2018), conforme Figura 03.

**Figura 03.** Origem de um dipolo induzido e movimentação da nuvem eletrônica no espectro visível para a NPsAg.



Fonte: Próprio autor.

Ao ser incidido uma luz no qual há excitação igual ao da frequência de oscilação dos elétrons do nanomaterial, ressonante, a extinção óptica é consideravelmente aumentada, pois o campo elétrico próximo à superfície da nanopartícula é bastante intensificado. As condições de ressonância ocorrem quando a frequência da luz incidente corresponde à frequência dos elétrons de condução oscilando sob a influência do campo eletromagnético e opondo-se a uma força restauradora em direção à distribuição de equilíbrio. A posição e a largura das bandas SPR dependem do tamanho, formato e ambiente da NP. Em NPs esféricas menores que 40 nm, os elétrons se movem em fase após a excitação de onda plana, que é conhecida como limite quase estático, onde a ressonância é dada por um modo dipolar (LANGER et al., 2015).

Há uma dependência linear do valor da absorvância da amostra com o volume da nanopartícula. Conforme o tamanho da nanopartícula aumenta, a polarização da nuvem eletrônica deixa de ser gerada de forma homogênea, o que leva a excitação de outros modos multipolares. A ressonância destes modos ocorre em comprimentos de onda mais elevados. Na região da aproximação dipolar, a largura da banda de absorção de plasmon, que contabiliza uma polarização residual dos elétrons ligados aos núcleos que, de certa forma, influencia a resposta dos elétrons livres. Os elétrons livres das nanopartículas, postos a oscilar pela presença do campo elétrico externo, sofrem os denominados de processos de espalhamento no interior da nanopartícula (LINK et al., 1999; MAIER, 2007).

Além da espectroscopia na região do ultravioleta e visível, pela ressonância plasmônica de superfície para análises na presença de nanopartículas, o infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR) foi gradativamente abordado em análises de estruturas mais complexas, como de biomarcadores, atividade de enzimas e produtos farmacêuticos (EID, 2018; EID et al., 2020; TSAI et al., 2019).

Uma técnica denominada espectroscopia de absorção no infravermelho intensificada por superfície (*Surface enhanced infrared absorption spectroscopy - SEIRA*), que é o aumento da absorção que pode chegar na ordem de até 1000, quando as substâncias estão em contato com um filme de metal como ouro, prata e platina. Esse fenômeno por sua vez, apresenta a possibilidade de análise de traços de substâncias nas superfícies dos materiais, tornando a técnica ainda mais eficiente e poderosa (BJERKE et al., 2002, HARTSTEIN et al., 1980). O SEIRA possui assim como a espectroscopia FTIR tradicional, as mesmas vantagens, sendo uma análise não destrutiva, podendo ser empregada no acoplamento com nanotecnologia, ferramentas quimiométricas e mesmo análise da superfície de eletrodo (ATAKA et al., 1996; MAYERHÖFER et al., 2018).

### 1.3 Proteases

As enzimas são biomoléculas capazes de catalisar reações químicas que, de outro modo, ocorreriam em uma taxa de desenvolvimento extremamente baixa. Entretanto, elas não alteram o ponto de equilíbrio das reações nas quais catalisam, pois não são consumidas ou sofrem alterações permanentemente durante a reação e estão presentes em funções essenciais nos seres vivos, como na digestão e envio de sinais nervosos (NELSON et al., 2014).

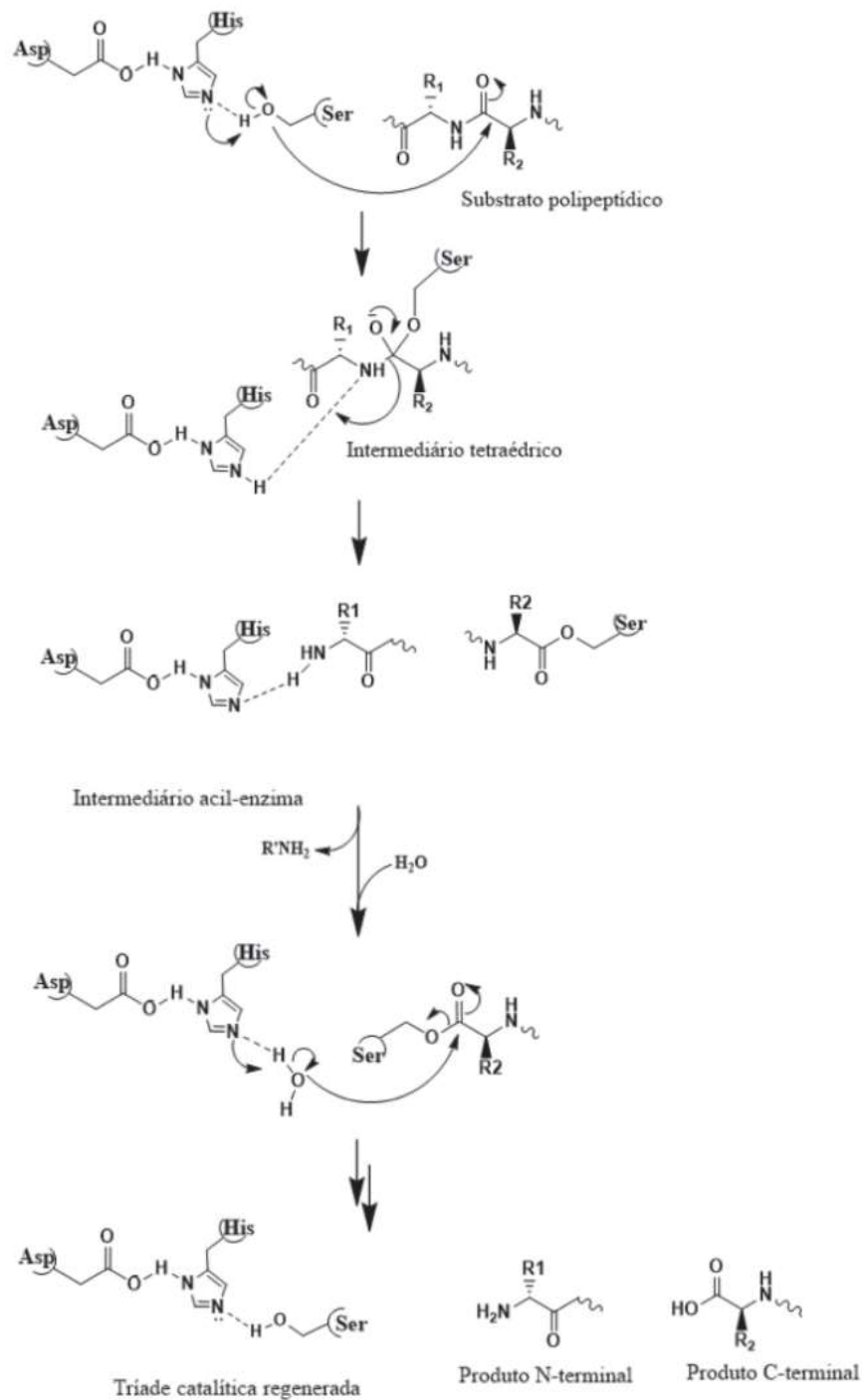
As proteases são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas, liberando aminoácidos, peptídeos, proteínas de peptídeos e proteínas menores. O termo protease tem sido frequentemente assumido como sinônimo de "peptidase" e para abranger os termos "proteínase". Este tipo de enzima está amplamente presente nos seres vivos, no qual representa cerca de 2% de todas as proteínas presentes nestes (RAWLINGS et al., 2011). Seu mecanismo de catálise é classificado pela especificidade do sítio ativo da enzima. São consideradas sete famílias de proteases: Aspártico, Cisteína, Glutâmica, Metalo, Asparagina, Serino e Treonina (MUTHU et al., 2017).

As serino proteases são endopeptidases que possuem a tríade catalítica formada por Ser, His e Asp, elas formam uma classe de enzimas proteolíticas relacionadas por ter presente em sua estrutura uma cadeia lateral de serina reativa (ANTÃO et al. 2005). O qual é responsável pelo ataque nucleofílico ao carbono carbonil de uma ligação peptídica apta (DVORAK et al., 2018).

Conforme Figura 04, a proximidade dessa tríade possibilita que ocorra um aumento na nucleofilicidade da Ser-195, pois a His-57 abstrai um próton da Ser-195 para formar um nucleófilo alcóxido e devido a influência mútua da Asp-102 e His-57 a entrada do próton,

provocando um ataque a ligação peptídica do C-terminal de um resíduo de lisina ou arginina. Ao promover o ataque a carbonila do substrato, gerando um intermediário tetraédrico. Ao se romper forma o produto N-terminal um intermediário, que pela presença de água possibilita o ataque ao grupo carboxila do substrato produzindo o produto e regenerando enzima, que está pronta para a próxima catálises (FURLANI et al., 2020).

**Figura 04.** Catalise enzimática para serino proteases.



Fonte: Furlani, 2020.

A utilização do conceito do mecanismo catalítico das enzimas proteolíticas se dá pelo compartilhamento dos mesmos inibidores comuns. Porém o tipo catalítico não apresenta relação com a evolução das enzimas. A maioria das metalopeptidases é inibida por moléculas complexantes, como 1,10-fenantrolina ou EDTA; grande parte das peptidases de serina é inibida por di-isopropil-fluorofosfato ou fenilmetano-sulfonil-fluoreto; e a maioria das peptidases de cisteína são inibidas pelo iodoacetato (BARRETT, 1994). Desta forma, as enzimas proteolíticas apresentam distintos graus de especificidade, a pepsina hidrolisa, clivando ligações peptídicas das quais participam grupos carboxílicos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) e a tripsina reconhece apenas ligações peptídicas formadas por arginina ou lisina (GERHARTZ, 1990).

#### **1.4 Tripsina**

A tripsina é uma serino protease, que exibe o resíduo de aminoácido "Ser" em seu sítio ativo como responsável pela clivagem peptídica. É excretada pelo pâncreas que a forma em suas células a partir da pró-enzima tripsinogênio. Sua atuação ótima ocorre em pH 7.8 e suporta um limite máximo de temperatura de 50-55°C para manter sua atividade, é constituída por 223 aminoácidos e peso molecular de 23,3 KDa. Sendo uma protease utilizada há mais de 5 décadas, como foco de estudos sobre sua importância comercial e fisiológica, por participar do processo digestivo, de coagulação do sangue e até mesmo de fertilização (DAVIE et al., 1991; HIROSE et al., 2001; LESK, 2001).

Em relação a estrutura primária da tripsina, ela se baseia na do tripsinogênio, que é convertida a partir da enzima enteroquinase e por auto ativação com tripsinas recém-formadas, com início no N-terminal na Ile, pela sequência dos resíduos de aminoácidos na Figura 05. Possui 12 resíduos de Cis - um aminoácido importante na formação da estrutura terciária de proteínas, já que seus grupos tiol formam as dissulfureto - o que aumenta sua estabilidade molecular e, conseqüentemente, sua resistência à proteólise.

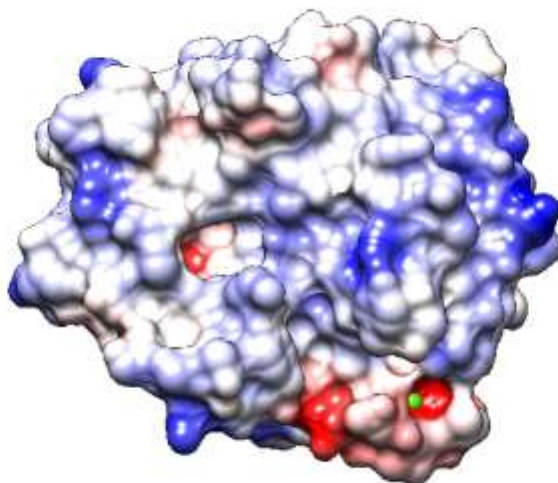
**Figura 05.** Sequência de resíduos de aminoácidos para tripsina de pâncreas bovino.

								ILE	VAL	GLY	GLY	TYR	THR	CYS	007
GLY	ALA	ASN	THR	VAL	PRO	TYR	GLN	VAL	SER	LEU	ASN	SER			020
GLY	TYR	HIS	PHE	CYS	GLY	GLY	SER	LEU	ILE	ASN	SER	GLN			033
TRP	VAL	VAL	SER	ALA	ALA	HIS	CYS	TYR	LYS	SER	GLY	ILE			046
GLN	VAL	ARG	LEU	GLY	GLU	ASP	ASN	ILE	ASN	VAL	VAL	GLU			059
GLY	ASN	GLU	GLN	PHE	ILE	SER	ALA	SER	LYS	SER	ILE	VAL			072
HIS	PRO	SER	TYR	ASN	SER	ASN	THR	LEU	ASN	ASN	ASP	ILE			085
MET	LEU	ILE	LYS	LEU	LYS	SER	ALA	ALA	SER	LEU	ASN	SER			098
ARG	VAL	ALA	SER	ILE	SER	LEU	PRO	THR	SER	CYS	ALA	SER			111
ALA	GLY	THR	GLN	CYS	LEU	ILE	SER	GLY	TRP	GLY	ASN	THR			124
LYS	SER	SER	GLY	THR	SER	TYR	PRO	ASP	VAL	LEU	LYS	CYS			137
LEU	LYS	ALA	PRO	ILE	LEU	SER	ASP	SER	SER	CYS	LYS	SER			150
ALA	TYR	PRO	GLY	GLN	ILE	THR	SER	ASN	MET	PHE	CYS	ALA			163
GLY	TYR	LEU	GLU	GLY	GLY	LYS	ASP	SER	CYS	GLN	GLY	ASP			176
SER	GLY	GLY	PRO	VAL	VAL	CYS	SER	GLY	LYS	LEU	GLN	GLY			189
ILE	VAL	SER	TRP	GLY	SER	GLY	CYS	ALA	GLN	LYS	ASN	LYS			202
PRO	GLY	VAL	TYR	THR	LYS	VAL	CYS	ASN	TYR	VAL	SER	TRP			215
ILE	LYS	GLN	THR	ILE	ALA	SER	ASN								223

Fonte: Próprio autor, PDB tripsina (1S0Q).

Para a estrutura tridimensional da tripsina é observado que possui arranjo globular com dois domínios de estruturas análogos. O primeiro abrange do 1º resíduo de aminoácido ao 105º e o outro do 106º ao 223º, estes seguimentos de aminoácidos estão ligados assimetricamente, e entre eles está localizado o sítio catalítico. A estrutura secundária da tripsina apresenta identidade parecida a do tripsinogênio, na qual exhibe majoritariamente estruturas de folhas beta que conectadas se estabelecem formando dois barris betas distintos que também é constituído por pequenos segmentos de alfa-hélice (LACERDA, 2014), e tripsina possui 10 resíduos negativos e 16 resíduos positivos (ProtParam<sup>50</sup>) que está ilustrado na Figura 06.

**Figura 06.** Estrutura tridimensional do mapa de potencial eletrostático da enzima tripsina, contendo 16 resíduos positivos (regiões azuis) e 10 resíduos negativos (regiões vermelhas) e sítio específico ligado a íon metálico cálcio (verde).



Fonte: Próprio autor, PDB tripsina (1S0Q).

A tripsina tem sítio específico para ligação do íon metálico cálcio (em verde), com afinidade de  $pKCa^{2+} = 3,4$  formado pelos aminoácidos Glu (52), Asn (54), Val (57), Gln (62) e duas moléculas de água (LACERDA, 2014).

Algumas proteínas tendem a se agregar sob certas condições formando estruturas com baixa solubilidade, gerando precipitados com forma de placas. Esses aglomerados estão relacionados a pelo menos 20 doenças com desvio de proteínas como a doença de Parkinson e Alzheimer, que são condições patológicas graves e irreversíveis (LYNCH et al., 2008).

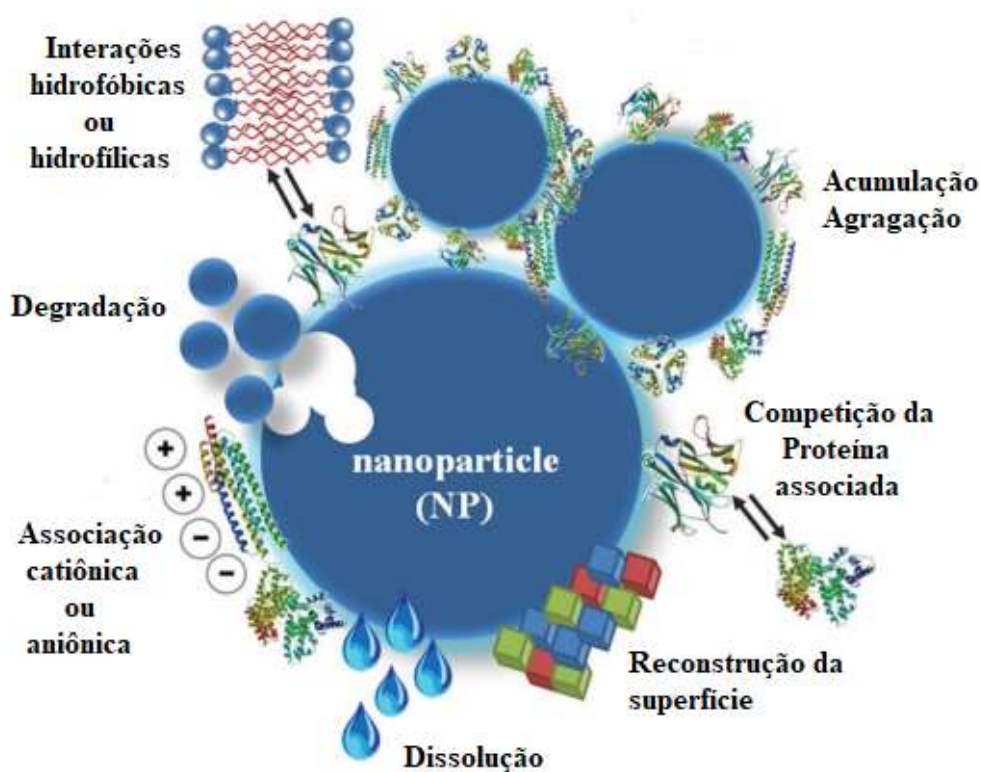
## 1.5 Biofuncionalização de Nanopartículas de Prata

Vários aspectos relevantes no recobrimento de NPsAg, seja na estabilização, na funcionalização ou na mudança de sua superfície em meio biológico, gerando as proteínas corona, podem mudar completamente sua atividade e até mesmo sua toxicidade. As nanopartículas de prata são responsáveis por desequilibrar o estado oxidativo nas células, pois inibem a atividade de enzimas antioxidantes, entretanto, ao serem funcionalizadas com albumina de soro bovino (BSA) e polietilenoglicol (PEG) diminui o efeito antagônico de NPsAg nas células, sugerindo que a presença das moléculas em sua superfície é fator importante na sua toxicidade (DURÁN et al., 2019). Com isso, há expansão no uso de nanopartículas para o desenvolvimento de medicamentos, dispositivos e ferramentas de diagnóstico, conhecida

como nanomedicina. As características e efeitos das NPs *in vivo* que podem ser bastante complexas devido às suas interações com as biomoléculas. Essas interações com fluidos biológicos ocasionados por nanopartículas, sendo envolvidos de forma dinâmica por coroas de proteínas, que transportam como uma interface entre os NPs e seu ambiente, seja plasma, tecido ou sangue. E as formas de interações entre e nanopartícula revestida por biomoléculas e o meio depende do ambiente biológico, das propriedades das proteínas interagindo em sua superfície, bem como das novas propriedades biológicas, químicas e físicas da nanopartícula que foi alterada pela biomolécula a qual a regeste (CAPJAK et al., 2017).

Devido a diversos tipos de interações, existe continuamente a mudança da interface nanobio em um ambiente biológico, ainda mais em um organismo vivo no qual são secretados diversos produtos celulares o tempo todo. As nanopartículas ao se movimentarem de um compartimento biológico para outra, o perfil da proteína corona irá mudar, conforme Figura 07.

**Figura 07.** Possíveis interações da nanopartículas em meio biológico.



Fonte: adaptado de CAPJAK, I. 2017.

A adsorção de proteínas e interação com nanopartículas podem proporcionar mudanças conformacionais e/ou aglomeração de proteínas na superfície das NPs, podendo até haver a formação de espécies reativas de oxigênio que causará danos oxidativos as proteínas adsorvidas. Essas interações entre algumas nanopartículas e proteínas podem formar complexos

transitórios com nanopartículas, enquanto outras serão fortemente ligadas, dependendo das nanopartícula (material, morfologia, tamanho) e as soluções biológicas em que as NPs estão suspensas (TREUEL et al., 2012).

Waghmare e colaboradores (2018), em seu trabalho, estudou a adsorção da proteína BSA em NPsAg por espalhamento dinâmico de luz, fluorescência e espectroscopia de UV-visível, procedendo em um aumento gradual significativo no raio hidrodinâmico médio da NPsAg/BSA de 24 para 35 nm, observando a perda de helicidade na estrutura secundária de BSA, foram consideradas biocompatíveis com a membrana de glóbulos vermelhos e os resultados do modelo de isoterma de adsorção validaram a formação de multicamadas da proteína albumina em nanopartículas de prata.

Wang (2017) também desenvolveu estudos sobre NPsAg/BSA que indicaram que interação de forma estática com a formação de um complexo de estado fundamental com forças atuantes hidrofóbicas, com nanopartículas de cerca 40 nm.

Babu (2015), sintetizou NPsAg revestidas com chá verde, obtendo altamente estáveis, e usou como sonda colorimétrica e óptica para a detecção de cisteína. Por um ensaio simples sensível e seletivo a absorvância dos NPsAg foi extinta de forma eficiente na presença de cisteína.

Chen (2017) desenvolveu um novo nanosensor óptico por meio de uma montagem de UCNPs (*Upconversion nanoparticles*) e STNPs (*Silver triangular nanoplates*) para detecção ultrasensível de tripsina e protamina. Li e colaboradores (2018) pesquisaram a interação de NPsAg com tripsina em soluções aquosas e analisaram o mecanismo de ligação e o comportamento cinético, indicando que para nanopartículas de prata que foram sintetizadas por meio de redução química com citrato de sódio sobre aquecimento até total evaporação, com obtenção de nanopartículas de tamanho de  $40 \pm 5$  nm, que a interação entre a NPsAg e tripsina é espontânea pela natureza eletrostáticas e hidrofóbicas das forças atuantes, pelo estudo da supressão de fluorescência.

Em vista disso, este trabalho visa sintetizar nanopartículas de prata e investigar a interação entre NPsAg e enzima tripsina pelas mudanças de suas características espectrais e morfológicas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Estudar a interação entre a enzima tripsina e nanopartículas de prata.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Sintetizar nanopartículas de prata através do método da co-redução química;
- Caracterizar as NPsAg e NPsAg/Tri, por espectroscopia de UV-Vis, MET (Microscopia eletrônica de transmissão), EDL (Espalhamento dinâmico de Luz), EDS e Potencial Zeta;
- Estudar a mudança estrutural da enzima livre e enzima adsorvida nas NPsAg por FTIR e DC.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos estão listados na Tabela 01 a seguir:

**Tabela 01** - Equipamentos utilizados nos experimentos.

Equipamento	Fabricante
Microscópio eletrônico de transmissão	JEOL <sup>®</sup>
Espectrômetro FITR Vertex 70v	Bruker <sup>®</sup>
Zetasizer Nano Series	Malvern <sup>®</sup>
Espectrofotômetro V-760	Jasco <sup>®</sup>
Espectropolarímetro J-815	Jasco <sup>®</sup>

Fonte: Próprio autor.

#### 3.2 Materiais

Os materiais e vidrarias utilizados foram limpos antecipadamente para prevenir possíveis contaminações. As soluções foram preparadas em água ultrapura com resistividade de 18,2 MΩ cm. Os reagentes e materiais utilizados estão listados na Tabela 02 abaixo:

**Tabela 02.** Lista de materiais e reagentes.

Fórmula	Nome	Procedência
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de Prata	Synth <sup>®</sup>
NaBH <sub>4</sub>	Borohidreto de sódio	Synth <sup>®</sup>
TSC	Citrato Trissódico	Synth <sup>®</sup>
NaOH	Hidróxido de Sódio	Synth <sup>®</sup>
Tri	Tripsina de pâncreas bovino (CAS No. 9002-07-7)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio dibásico	Synth <sup>®</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássio	Synth <sup>®</sup>
KCl	Cloreto de potássio	Synth <sup>®</sup>

---

Fonte: Próprio autor.

### 3.3 Procedimento experimental

#### 3.3.1 Síntese das NPsAg

Em agitação constante a uma temperatura de 60° C foram adicionados 240 mL de Borohidreto de Sódio (NaBH<sub>4</sub>; 5 mmol/L) e 240 mL de Citrato de Sódio (TSC; 3,55 mmol/L), após 30 minutos. Posteriormente acrescentou-se gota a gota 20 mL de Nitrato de Prata (AgNO<sub>3</sub>, 3 mmol/L). A temperatura foi elevada para 90° C e simultaneamente adicionado 50 mL de Hidróxido de Sódio (NaOH; 0,1 mol/L), a agitação continuou por 20 minutos. Após a solução estar em temperatura ambiente foi centrifugada 4 vezes a 10.000 rpm por 20 minutos, retirado o sobrenadante e adicionado água deionizada. As NPsAg foram armazenadas a 4° C, conforme metodologia adaptada de Agnihotri, 2014.

#### 3.4 Técnicas de caracterização:

Para caracterizar a enzima tripsina, foram utilizadas as seguintes técnicas: espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis, Dicroísmo Circular (DC), microespectroscopia de FTIR ( $\mu$ -FTIR), Espalhamento Dinâmica de Luz (EDL). E para as caracterizações das NPsAg e NPsAg/Tri foram utilizadas espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis, Potencial Zeta ( $\zeta$ ), EDL, espectroscopia de FTIR e microscopia eletrônica de transmissão (MET), que serão descritos pelos seguintes tópicos. As caracterizações foram realizadas no IQSC juntamente com o Laboratório de Bioeletroquímica e interfaces.

##### 3.4.1 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível – UV-Vis

Utilizou-se a espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis para monitorar as bandas de absorção, características da NPsAg e da tripsina. Desta forma foi utilizado um espectrofotômetro Jasco V-760 no intervalo de 200 a 800 nm em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

A espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) indica as transições entre níveis de energia eletrônica que resultam na absorção de radiação eletromagnética na região do espectro. Medindo a absorbância (A) ou a transmitância (T) de soluções ou suspensões coloidais presentes no interior da cubeta, seguindo um caminho óptico

$b$  (cm). Portanto, a relação entre a absorvância ( $\epsilon$  corresponde a absorvância do analito) e a concentração do analito é estabelecida pela equação de Lambert-Beer (Equação 1).

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

A obtenção de um espectro de absorção ocorre através da interação entre a radiação e as moléculas, excitando os elétrons a níveis de energia mais altos, podendo ocorrer, tanto no espectro visível, quanto no ultravioleta, dependendo dos níveis que os elétrons podem atingir, resultando a representação de uma banda de absorção (PAVIA et al., 2009).

A região do espectro eletromagnético de maior interesse é a de transição entre o visível e o ultravioleta, comprimentos de onda próximos a 400 nm. Neste comprimento de onda a radiação eletromagnética interage com as nanopartículas de prata em escala nanométrica e fornece informações relevantes sobre a condição da dispersão coloidal (MULVANEY, 1996; XIA et al., 2005).

Os primeiros a investigar utilizando o eletromagnetismo clássico (BORN, 1980; KREIBIG et al., 1995) que é a interação entre a radiação eletromagnética e uma esfera condutora em meio homogêneo, chamada de onda de plana, foram Gustav Mie (1908) seguido por Peter Debye (1909). Que interpretaram que o campo eletromagnético ocasiona a oscilação coletiva de elétrons, excitação denominada *plasmons*. A radiação absorvida/espalhada pelo conjunto pode ser tomada como o resultado de uma única partícula multiplicada pelo número de partículas no meio, permitindo uma relação entre a absorvância, ou coeficiente de extinção, no determinado comprimento de onda para a concentração de nanopartículas.

Acreditando que o decaimento da intensidade da radiação em função da concentração como proporcional a própria intensidade:

$$\frac{dI(l)}{dl} = -\alpha \cdot I(l) \quad (2)$$

Da qual a partir de sua solução se define  $\log_{10}$

$$\text{Absorvância } (\lambda) = \log_{10} (I/I_0) = \log_{10} (e^{-\alpha(\lambda) \cdot l}) \quad (3)$$

Na qual as nanopartículas não interagem umas com as outras

$$\alpha(\lambda) = \sigma_{\text{extinção}}(\lambda) \cdot \# \quad (4)$$

portanto

$$\text{Absorvância } (\lambda) = \sigma'_{\text{extinção}}(\lambda) \cdot \# \cdot l \quad (5)$$

No qual

$$\sigma'_{extinção} = \sigma_{extinção} / \ln 10 \quad (6)$$

Para os quais  $I$  e  $I_0$  representam a intensidade da radiação em comprimento de onda  $\lambda$  após o caminho óptico  $l$  percorrido dentro da amostra,  $\alpha$  uma constante de proporcionalidade de decaimento ( $[\alpha] = 1/m$ ),  $\sigma_{extinção}$  ( $\sigma_{extinção} = \sigma_{espalhamento} + \sigma_{absorção}$ ) a seção de choque de extinção de uma única partícula (de dimensão  $[\sigma_{extinção}] = m^2$ ), e  $\#$  o número de nanopartículas por unidade de volume ( $[\#] = 1/m^3$ ). Ocorrendo uma relação linear entre a absorvância e a concentração, que é o número de nanopartículas pelo volume. Deduziu-se para as soluções de Mie no campo eletromagnético espelhado pelas esferas condutoras a seção de choque de extinção como função de uma série dos coeficientes ( $B_l$ ), para qual cada coeficiente é proporcional ao diâmetro da esfera e o comprimento de onda da radiação incidida. Levando a seguinte equação:

$$\sigma_{extinção}(\lambda, q) = \frac{\lambda^2}{2\pi} Re \sum_{l=1}^{\infty} (-i)^{l+1} \cdot l(l+1) \cdot [B_l^e(q) + B_l^m(q)] \quad (7)$$

Em que KREIBIG (1995):

$$q = 2\pi r / \lambda \quad (8)$$

em que a sobreposição de soluções é representado por  $e$ ,  $m$  e  $r$  é o raio da nanopartícula. No limite quase-estático ( $|q| \ll 1$ ), no qual o tamanho das partículas é inferior ao comprimento de onda incidido, podendo ser desconsiderada a seção de choque de extinção em ordem superior de razão  $r/\lambda$ , considerando apenas da somatória os primeiros termos  $B_l^{e,m}$  que são correspondentes a  $q^3$ :

$$\sigma_{extinção}(\lambda) = \frac{18\pi \cdot \varepsilon_{meio}^{3/2} \cdot V}{\lambda} \cdot \frac{\varepsilon_2(\lambda)}{[\varepsilon_1(\lambda) + 2\varepsilon_{meio}]^2 + \varepsilon_2^2(\lambda)} \quad (9)$$

Volume da nanopartícula ( $V$ ),  $\varepsilon_{meio}$  a função dielétrica,  $\varepsilon_1$  a parte real e  $\varepsilon_2$  a imaginária da função dielétrica do metal de composição da esfera. O espalhamento é proporcional ao quadrado dos coeficientes  $B_l$ , ocorrendo praticamente apenas por absorção ( $\sigma_{extinção} \approx \sigma_{absorção}$ ) (BORN, 1980). Desprezo termos para o campo eletromagnético de ordem superior a  $l=2, 3, 4...$  pois o espalhamento da radiação demonstra um dipolo oscilante. (BORN, 1980; KREIBIG et al., 1995). Havendo ressonância quando o denominador atingir o valor mínimo em valores maiores de para  $\sigma_{extinção}$  ( $\varepsilon_1(\lambda) = -2\varepsilon_{meio}$ ). E pelo modelo de Drude-Sommerfeld para a resposta óptica de metais de elétrons livres respeitando o limite  $\omega \gg \Gamma$ , é possível extrair aproximações para  $\varepsilon_1$  e  $\varepsilon_2$ :

$$\varepsilon_1 \approx 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}; \varepsilon_2 \approx 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^3} \Gamma \quad (10)$$

No qual  $\omega_p$  é a frequência de plasma de Drude do material e  $\Gamma$  a constante de amortecimento fenomenológica do material (KREIBIG et al., 1995). Desta forma o choque de extinção é determinado pelo:

$$\sigma_{extinção}(\omega) \propto \frac{1}{\left[\omega - \frac{\omega_p}{\sqrt{1+2\varepsilon_{meio}}}\right]^2 + \left(\frac{\Gamma}{2}\right)^2} \quad (11)$$

Estimando então que a amostra se propicia um estado quase-estático se matem a condição que  $\varepsilon_1(\lambda) = -2\varepsilon_{meio}$

### 3.4.2 Estimativa de concentração de Ag e NPsAg

A partir de uma solução estoque 20 mmol/L de  $\text{AgNO}_3$ , preparou-se as soluções de concentração 2, 3, 4, 5 e 6 mmol/L, onde foram usadas para a construção da curva de calibração. As leituras foram realizadas em duplicata com um espectrofotômetro Jasco V-760 no intervalo de 200 a 800 nm em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Uma alíquota de NPsAg foi digerida em ácido nítrico concentrado e pela equação da reta, quantificada a quantidade de prata na amostra.

Para estimar a concentração de NPsAg, considerou-se monodispersa essa solução coloidal. Também se considerou o arranjo mais comum para NPsAg, que é cúbica de face centrada (CFC) (KISS et al., 2011) para o cálculo de átomos por nanopartícula e que o parâmetro de rede contendo 4 átomos,  $a = 4,09 \text{ \AA}$ . Considerando a nanopartícula como esférica e de raio  $r$ , o número de Ag por nanopartícula ( $Ag_{AgNP}$ ) será:

$$Ag_{AgNP} = 4 \cdot \frac{\text{Volume da nanopartícula}}{\text{Volume célula unitária}} = 4 \cdot \frac{4\pi r^3/3}{a^3} \quad (12)$$

Então o número total de nanopartículas ( $NPsAg_{total}$ ) é dado por:

$$AgNPs_{total} = \frac{N}{\text{Volume da solução}} = \frac{\text{Total de átomos de Ag} / \#Ag_{AgNP}}{\text{Volume da solução}} \quad (13)$$

### 3.4.3 Dicroísmo Circular - DC

O Dicroísmo circular (DC) vibracional é uma técnica que corresponde a variação da espectroscopia de absorção, utilizando a diferença entre a absorção da luz circular polarizada

que se direciona para a direita ou para esquerda na análise das amostras (BERTUCCI et al., 2010). Nas análises de biomoléculas o uso do dicroísmo circular para investigação de grupamentos amida, que são relacionadas as porções  $\alpha$ -hélice e folhas- $\beta$  presentes nessas macromoléculas, torna possível a identificação da estrutura secundária de proteínas, bem como a suas mudanças conformacionais (BEYCHOK, 1996; FASMAN, 1996).

Em um espectropolarímetro Jasco J-815 foram obtidos os espectros de dicroísmo circular a partir de uma média de 10 acumulações com velocidade de varredura de 100 nm/min, na região de UV distante (300 – 190 nm) em cubeta com 0,2 cm de caminho óptico a uma temperatura de 293 K, em concentrações de tripsina  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L e NPsAg  $1.0 \times 10^{-10}$  mol/L.

#### **3.4.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho - FTIR**

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utiliza de uma radiação de menor energia associada às transições eletrônicas, se comparado à espectroscopia na região do UV-Vis, para que as transições sejam induzidas (CONSTANTINO, 2008). Desta forma, o FTIR é utilizado para conseguir informações a respeito das variações nos modos de vibração ou modos de rotação dos átomos de uma determinada molécula, uma vez que há um grande número de estados vibracionais associados a estes átomos, assim, cada molécula possuindo frequência de vibração característica.

Os espectros de FTIR foram realizados no modo transmissão na região de 3800 a 900  $\text{cm}^{-1}$  utilizando o espectrômetro de FTIR Bruker Vertex 70v com o detector FPA, com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  e 128 acumulações, por meio de um substrato de fluoreto de cálcio.

#### **3.4.5 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 et al., 2012).

As medidas de EDL foram realizadas 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.

#### **3.4.6 Microespectroscopia-FTIR ( $\mu$ -FTIR)**

As imagens microscópicas foram obtidas no microscópio Hyperionn 3000, o qual está acoplado ao espectrômetro de FTIR Bruker Vertex 70v. Esse microscópio é equipado com um

detector FPA (*Focal Plane Array*), que permite a obtenção de espectros de 4096 regiões diferentes, separadas por 2,7  $\mu\text{m}$  entre si. A partir dos espectros distribuídos no espaço são gerados imagens relativos à intensidade de modos vibracionais característicos da amostra.

Para a análise da estrutura secundária da proteína, utilizou-se a região relativa a amida I (1600 a 1690  $\text{cm}^{-1}$ ) subtraindo a linha de base, posteriormente, realizando a segunda derivada de cada gráfico, com os picos presentes foram simulados em funções Gaussianas no espectro original. Uma vez que na literatura já é bem estabelecido as bandas características de cada tipo de estrutura secundária presente nas enzimas, é possível calcular a porcentagem de cada tipo pela área da cada curva Gaussiana (ARRONDO et al., 1999; SUREWICZ et al., 1993).

Os mapas de superfície foram gerados considerando a banda da amida I distribuída ao longo da amostra, com detector FPA, com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  e 128 acumulações no modo transmissão. A amostra foi preparada depositada no  $\text{CaF}_2$ , 5  $\mu\text{L}$  da solução aquosa da enzima (1  $\text{mg mL}^{-1}$ ) em um substrato de fluoreto de cálcio e em seguida seca a temperatura ambiente em estufa.

### **3.4.7 Potencial Zeta ( $\zeta$ )**

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 ( $\pm 30$  mV) confere estabilidade, resistindo à agregação, conforme Tabela 03. 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, proteínas (BALLOTTIN, 2014).

Os fatores que influenciam o potencial Zeta são: o pH da substância, pelas cargas positivas e negativas relacionadas; a força iônica, quão maior este parâmetro, mais próximo de zero; e a concentração, é possível relacionar que com o aumento da concentração aumenta o potencial Zeta (BHATTACHARJEE, 2016).

**Tabela 03.** Classificação de estabilidade de coloides segundo o potencial Zeta.

Potencial	Estabilidade
0 - ±10 mV	Instável
±10 mV - ±20 mV	Relativamente estável
< 30 mV >	Estável

Fonte: Tabela de autoria própria, dados extraídos de (BHATTACHARJEE, 2016).

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). Dada a força de atrito depende da viscosidade do meio, as partículas irão adquirir velocidade constante a partir do repouso a depender do valor do campo elétrico aplicado ( $\vec{u} = \vec{v}/\vec{E}$ ), estimando-se pela equação a distribuição do potencial Zeta:

$$\zeta = \frac{3\eta|\vec{u}|}{2\varepsilon_r\varepsilon_0} \quad (14)$$

em que  $\eta$  é a viscosidade do meio,  $\varepsilon_r$  a permissividade relativa do meio e  $\varepsilon_0$  a permissividade do vácuo (EVANS et al., 1999).

As medidas de potencial zeta foram realizadas em um Zetasizer Nano Series Malvern, a 25°C. As soluções foram diluídas para 50 mg L<sup>-1</sup> em PBS 5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4.

### 3.4.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram obtidas no equipamento JEOL JEM2100 LaB<sub>6</sub>– 200 kV. As soluções de NPsAg e NPsAg/Tri foram gotejadas em grades para microscopia que foram secas durante 48 horas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese, caracterização e quantificação das NPsAg.

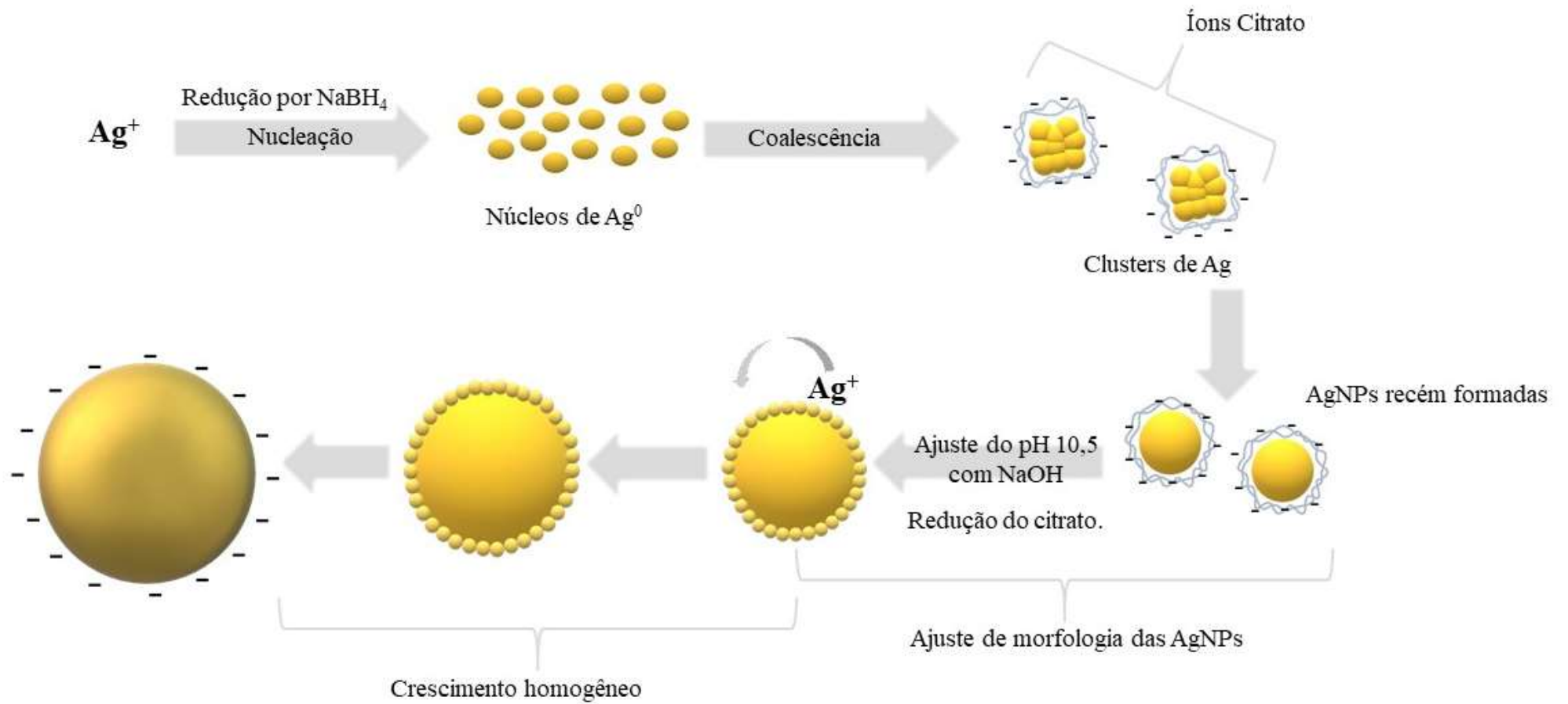
A síntese das nanopartículas de prata estabilizadas por citrato trissódico foi realizada baseando-se no método de Agnihotri (2014) com adaptações. Esse método consiste na adição de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) em um agente redutor forte ( $\text{NaBH}_4$ ), na presença do redutor fraco que age como matriz estabilizadora (TSC).

O agente redutor utilizado neste trabalho foi o  $\text{NaBH}_4$ , um redutor forte, por ter potencial de redução alto, reprodutível e tem eficácia para síntese de nanopartículas menores (GOMES et al., 2013). Esta síntese foi inspirada no uso de tratamento térmico em duas etapas com co-redução, conforme sumarizado na Figura 08. Iniciando com a temperatura de 60 °C com o  $\text{NaBH}_4$  reduzindo e gerando grande número de NPsAg de tamanho muito pequeno, formando núcleos de prata pela diminuição de Número de oxidação (Nox) dos cátions presentes em solução, ou seja, ocorre a redução dos cátions de prata,  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , o que causa a formação de novos núcleos e conseqüentemente os clusters.

Posteriormente há o processo de crescimento pelo TSC, que é favorecido pelo aumento de temperatura para 90 °C. A presença de TSC desde o início da reação controla o processo de nucleação prevenindo aglomerações. E a variação da temperatura controla a capacidade de redução de  $\text{NaBH}_4$  e TSC, facilitando o controle de tamanho, assim como a base utilizada na etapa final da síntese controla a taxa de redução, propiciando um maior controle também da morfologia (AGNIHOTRI et al., 2014).

A suspensão final da síntese foi centrifugada e ressuspensa até volume de 20 mL em PBS 5 mmol/L, retirando qualquer vestígio de  $\text{NaBH}_4$ , para que não ocorra qualquer ação deste na enzima nos futuros estudos de interação, e armazenado a 4°C sem contato com a luz.

**Figura 08.** Imagem do processo de síntese de NPsAg pelo método de co-redução química por  $\text{NaBH}_4$  e TSC, e controle de tamanho pelo pH.



Fonte: Próprio autor.

Uma evidência da formação de prata com dimensões nanométricas observa-se na Figura 09, que é a solução de coloração amarela, uma vez que nenhum dos reagentes utilizados ( $\text{AgNO}_3$ , TSC,  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{NaOH}$ ) apresenta cor. Essa solução coloidal micro heterogênea apresenta tal coloração devido a interação da radiação da luz com a superfície do nanomaterial, possuindo cor amarela por absorver na região do violeta de 400 a 430 nm (PAVIA, et al. 2009).

**Figura 09.** Imagem da solução coloidal de NPsAg obtida após processo de síntese.



Fonte: Próprio autor.

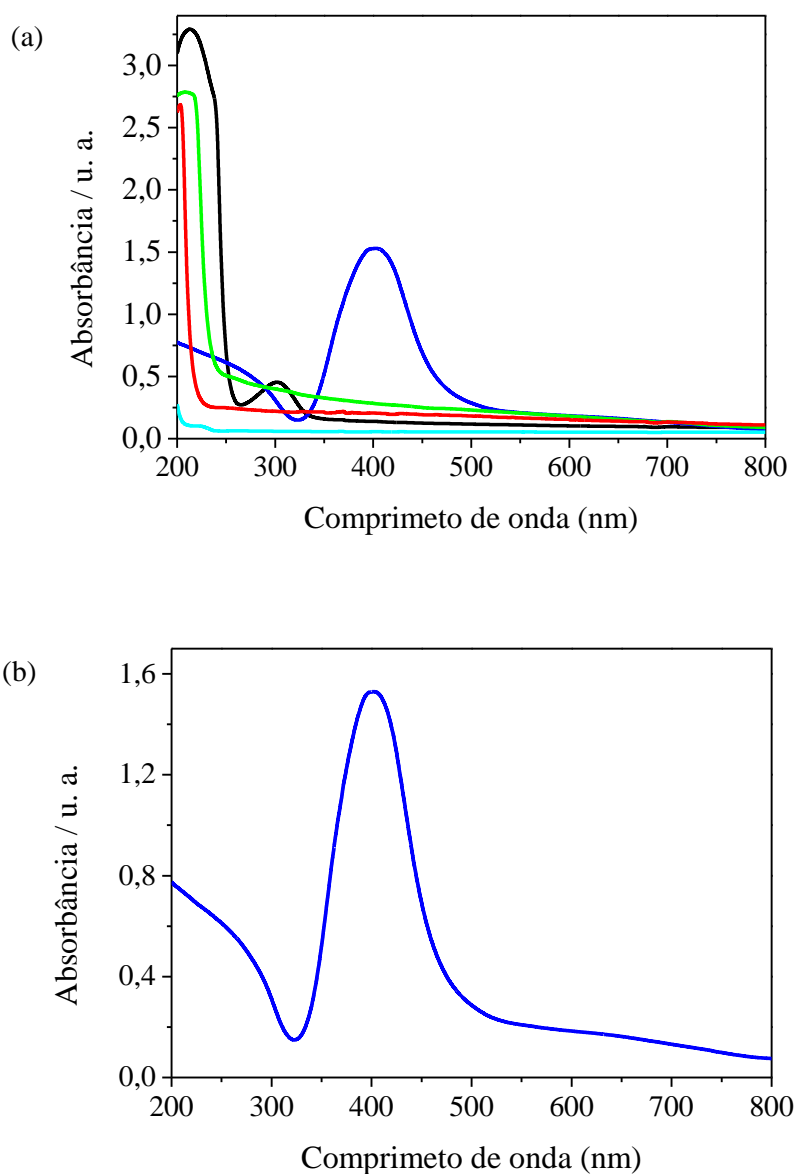
A formação da Np pode ser comprovada através da caracterização por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. No espectro de absorção no UV-Vis, Figura 10 a, pode ser observada uma banda com absorção máxima em 407 nm para o produto na síntese, em azul, e para os respectivos reagentes ( $\text{AgNO}_3$ ; TSC;  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{NaOH}$ ), que não apresentam absorbância nesta região.

A banda em 407 nm (linha azul) é típica de nanomateriais que possuem ressonância plasmon de superfície, gerada pela movimentação coletiva dos elétrons pelo campo eletromagnético de seu dipolo, polarizando as NPsAg. Para a solução de NPsAg o espectro de absorção, no qual é expresso por absorbância significa que se equivale ao processo de extinção (absorção + espalhamento). Entretanto, a elevação da linha de base é proporcionalmente mais baixa que o sinal da absorção, pois a interação com a luz é bem maior que o choque geométrico (EVANOFF et al., 2005).

Para a solução de  $\text{AgNO}_3$ , em preto, há apenas uma discreta banda de absorção com máximo em 304 nm, característico das transições eletrônicas dos elétrons dos orbitais *d* do

íon  $\text{Ag}^+$  dissociados em solução. Na Figura 10b, pode ser melhor observado o espectro para NPsAg que mostra uma banda bem definida, pouco alargada, que indica formação de nanopartículas monodispersas. A única banda sugere um alcance da síntese no controle de morfologia, pois outra morfologia ocasionaria outras bandas por ocorrer mais de um direcionamento da ressonância plasmônica de superfície. Além disso, pelo perfil simétrico da banda de *SPR*, reforça que essas nanopartículas possuem forma aproximadamente esféricas. A banda observada em comprimentos de onda inferiores a 320 nm é inerente das transições de elétrons das bandas de valência à de condução da prata ( $4d - 5sp$ ), conforme Kreibig (1995) descreveu em seu trabalho.

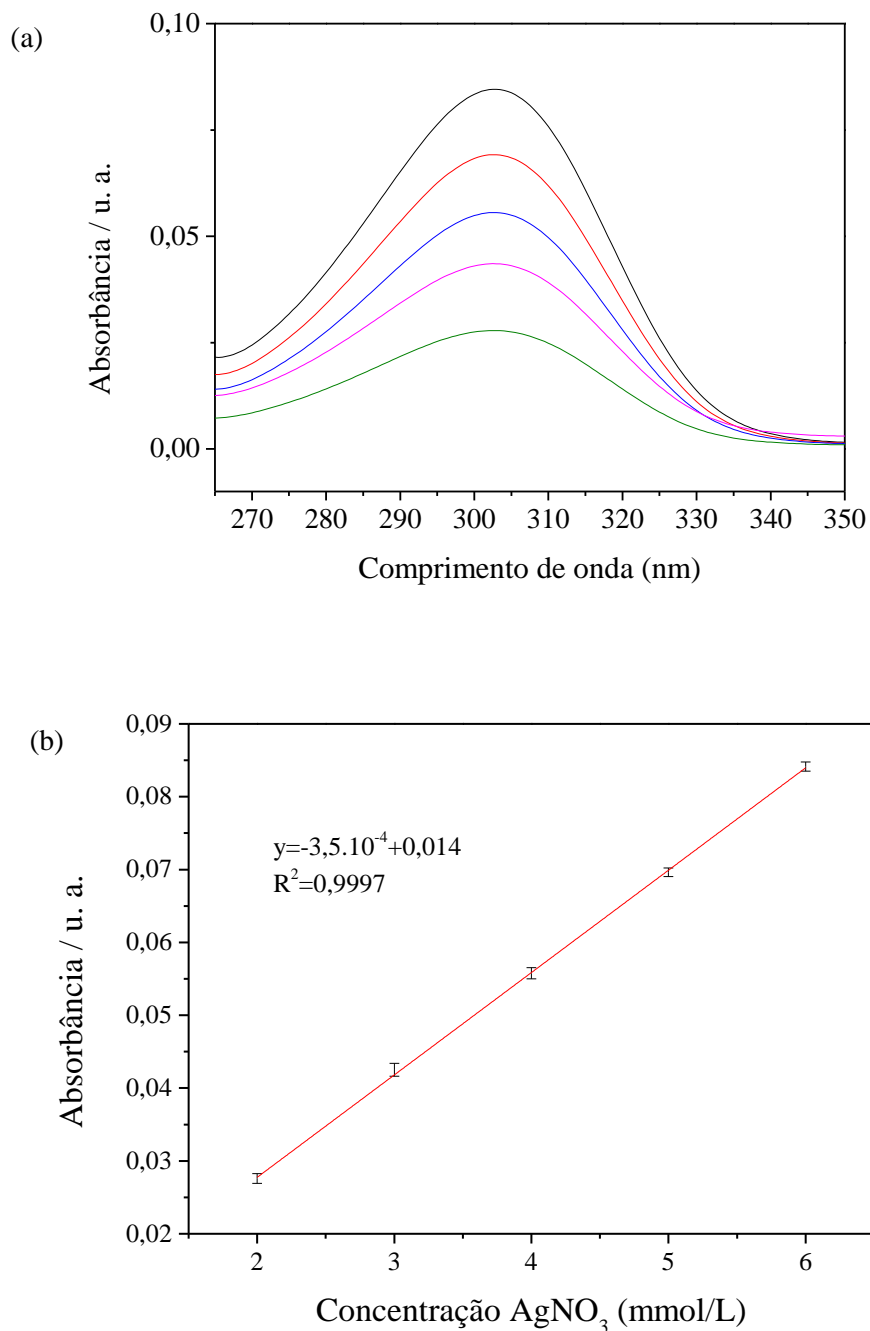
**Figura 10.** Espectro de UV-Vis para  $\text{AgNO}_3$ , em preto; Citrato trissódico, em verde;  $\text{NaBH}_4$ , em vermelho;  $\text{H}_2\text{O}$  em azul claro e NPsAg em azul (a); Espectro da solução coloidal de NPsAg (b).



Com o intuito de quantificar a concentração de prata, inicialmente foi construído uma curva de calibração variando as concentrações de nitrato de prata conforme Figura 11 a. Esses dados foram plotados, gerando o gráfico de Abs versus concentração de nitrato de prata (mmol/L), Figura 11b, e por meio da equação linear gerada foi possível converter os valores de ABS da amostra testada para concentração.

$$y = a + b \cdot x \quad (15)$$

**Figura 11.** Espectros de UV para  $\text{AgNO}_3$  nas concentrações de 2, 3, 4, 5 e 6 mmol/L (a); gráfico de ABS versus concentração de  $\text{AgNO}_3$  (b).

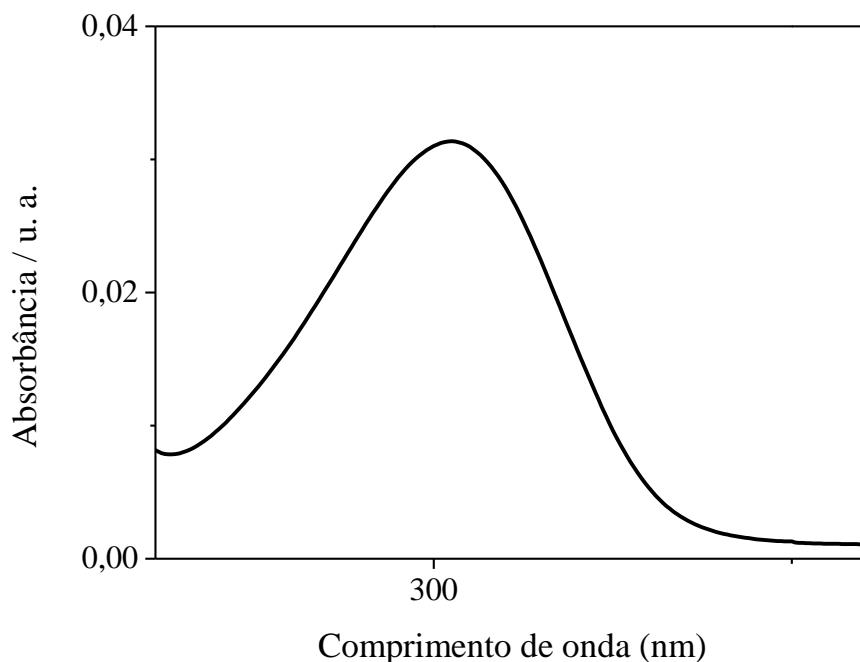


Então a concentração para solução das nanopartículas digeridas com ABS = 0,031 conforme Figura 12, é dada por:

$$0,031 = 3,5 \cdot 10^{-4} + 0,014 \cdot x$$

$$x = 2,2 \text{ mmol/L}$$

**Figura 12.** Espectro de UV-Vis para NPsAg digeridas em ácido nítrico.



Fonte: Próprio autor.

Com a concentração de prata estabelecida em 2,2 mmol/L foi possível calcular a concentração de nanopartículas em solução, em que o número total de átomos de prata em um volume de 20 mL:

$$Ag = 2,2 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \cdot 0,02\text{L} \cdot 6,02 \cdot 10^{23} \frac{\text{átomos}}{\text{mol}} = 2,649 \cdot 10^{19} \text{ átomos}$$

Relacionando então o número de átomos de prata por nanopartícula, utilizou o valor do raio obtido por MET de 26 nm, por considerar apenas a superfície metálica e não seu movimento no meio, na equação 12:

$$Ag_{AgNP} = 4 \cdot \frac{4\pi(26\text{nm})^3/3}{(0,409\text{nm})^3} \cong 4,6 \cdot 10^6 \frac{\text{átomos}}{\text{nanopartícula}}$$

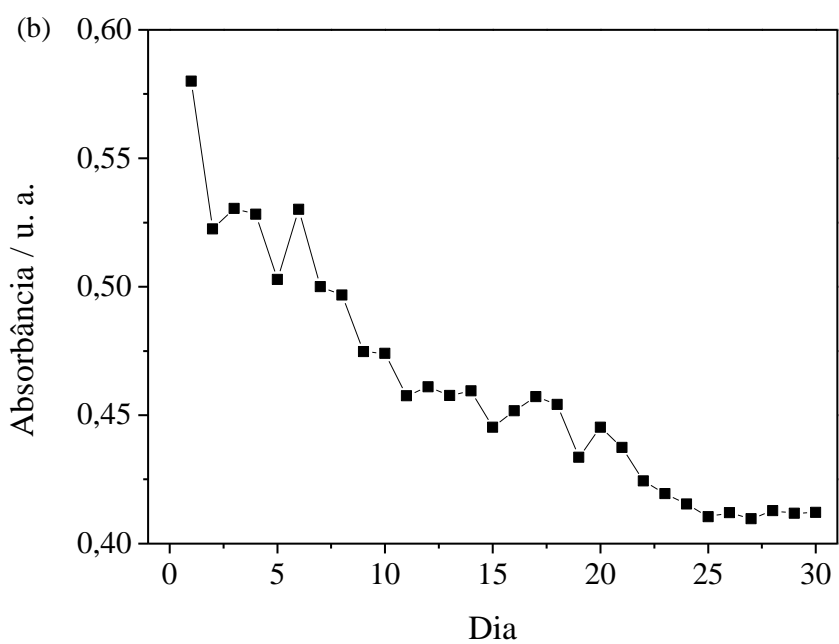
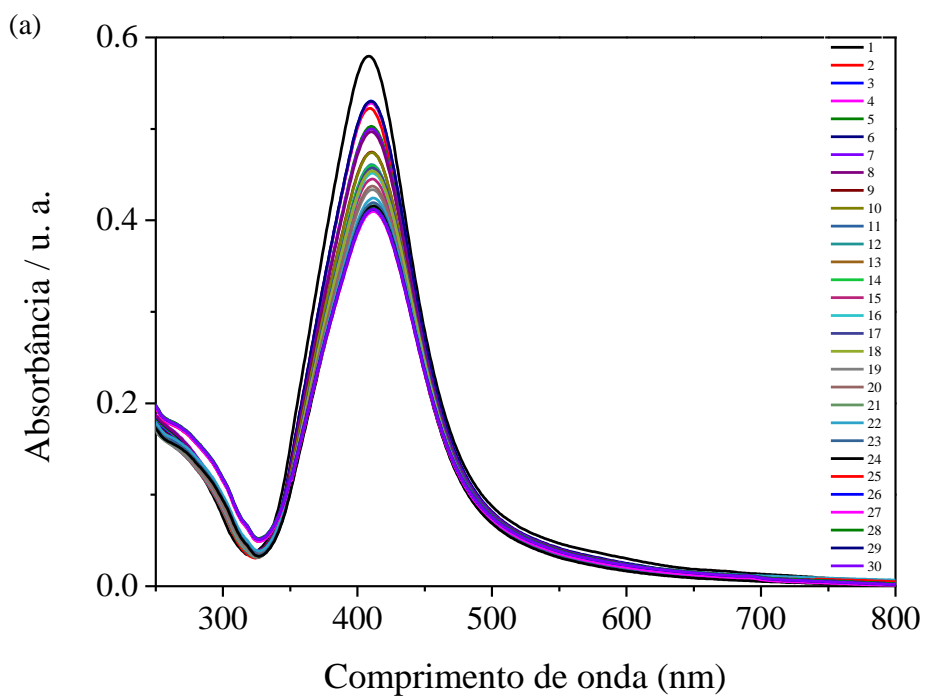
Considerando que todos os átomos de prata fazem parte de uma nanopartícula, resulta na concentração de NPsAg, conforme equação 13:

$$\begin{aligned}
 AgNPs_{total} &= \frac{N}{0,02L} = \frac{2,649 \cdot 10^{19} / 4,6 \cdot 10^6}{0,02L} \cong 3,077 \cdot 10^{14} \frac{\text{nanopartículas}}{L} \\
 &= \frac{3,077 \cdot 10^{14} \text{ nanopartículas}/L}{6,02 \cdot 10^{23} \text{ nanopartículas/mol}} \cong 0,51 \frac{\text{nmol}}{L}
 \end{aligned}$$

A estabilidade das NPsAg foi monitorada por espectroscopia na região do UV-Vis por um período de 30 dias com leituras realizadas com intervalos de 24 horas na região do espectro compreendida entre 200 a 800 nm. As soluções foram armazenadas a 4 °C e sem contato de luz.

Na Figura 13 a é possível observar no espectro uma mudança da absorbância entre o primeiro (linha preta) e o último dia (linha lilás), ocorrendo apenas um sutil deslocamento no comprimento de onda da banda de absorção de 407 nm para 410 nm, o corresponde as interações desta solução coloidal, indicando que estas nanopartículas permanecem na mesma faixa de tamanho. Mas há uma diminuição na intensidade do sinal, essa variação fica mais evidente quando se constrói um gráfico da ABS *versus* Dia, com os máximos de cada espectro (Figura 13 b). Observa-se que a maior variação ocorre do primeiro dia ao vigésimo segundo dia, mas que após a solução mantém a estabilidade, apresentando pouca oscilação na absorção da solução.

**Figura 13.** Espectro de UV-Vis para NPsAg durante 30 dias (a) e gráfico da absorbância versus dia (b).

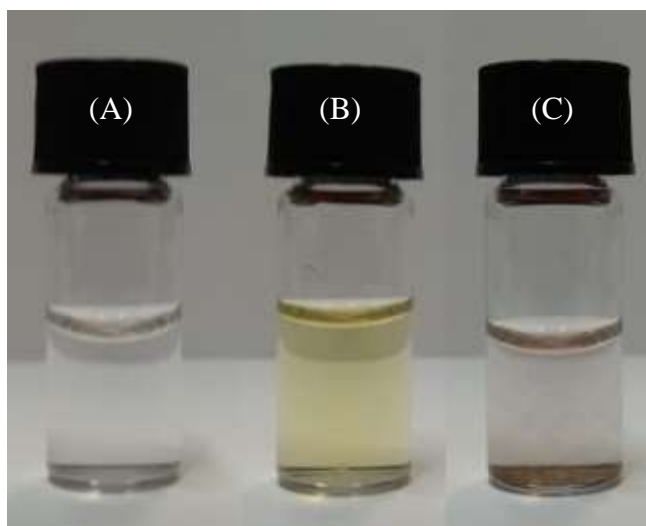


Fonte: Próprio autor.

## 4.2 Interação entre NPsAg e Tri por UV-Vis.

Posteriormente iniciou-se o estudo da interação entre NPsAg e a tripsina, no qual foi adicionado enzima à nanopartícula e deixando a 4° C por 24hrs, centrifugado e diluído em PSB 5mmol/L. Pode-se perceber a mudança na solução das nanopartículas, em que ao estar com a biomolécula há um descolamento do visível para o vermelho, obtendo uma coloração laranja, como pode ser observado na Figura 14.

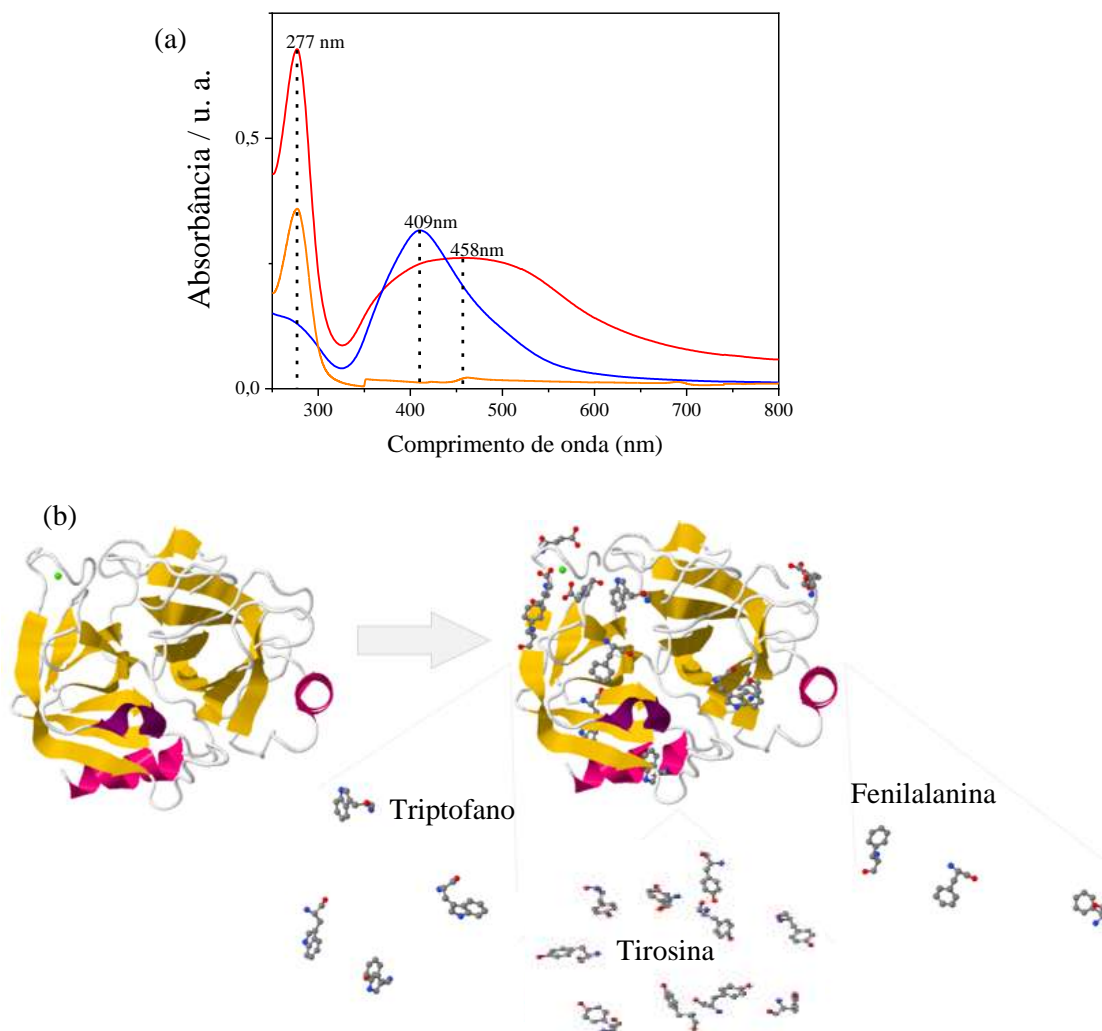
**Figura 14.** Imagem das soluções de tripsina  $2.10^{-2}$  mg/mL (a), 0,1 nmol/L NPsAg (b) e NPsAg/Tri (c).



Fonte: própria autoria.

Ao analisar o espectro de UV-Vis da Figura 15, percebe-se que para NPsAg em presença da tripsina em meio tamponado, há um alargamento da banda e consequentemente um deslocamento da absorção máxima para a direita, de 409 nm para 458 nm, absorvendo na região do azul, mudando a cor da solução de amarelo para laranja. Essa alteração indica que houve mudança de suas propriedades sintéticas pela agregação das mesmas, nas quais se tornam mais polidispersas, o que consequentemente eleva a linha de base pela maior dispersão da luz. No entanto, nota-se que a banda em 277 nm, relacionada a absorção aminoácidos aromáticos, Tirosina, Triptofano e Fenilalanina, pertencentes a enzima (SEGURA-GARCÍA et al., 1999). Isso mostra que as estruturas desses resíduos de aminoácidos não sofrem alterações com a interação.

**Figura 15.** Espectro de UV-Vis para solução de  $1.10^{-5}$  mol/L tripsina adsorvida por 24 horas em  $4^{\circ}\text{C}$  em 0,1 nmol/L NPsAg em tampão PBS 5 mmol/L (linha vermelha) e 0,1 nmol/L de NPsAg em tampão PBS 5 mmol/L (linha azul), tripsina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (linha laranja) (a), Estrutura tridimensional da enzima com resíduos de aminoácidos responsáveis por absorção em 280 nm (b).



Fonte: própria autoria, PBD tripsina (1S0Q).

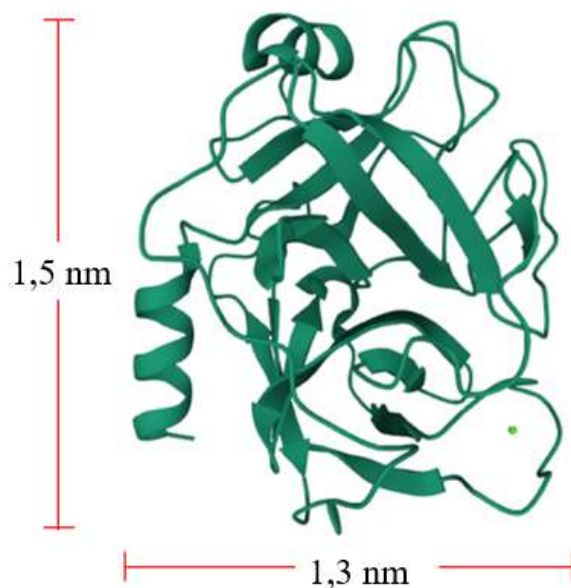
#### 4.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) e Potencial Zeta ( $\zeta$ )

Os experimentos de EDL e potencial zeta disponibilizarão informações a respeito da estabilidade coloidal e o perfil de distribuição de tamanho das nanopartículas em suspensão. O movimento browniano de partículas em solução é responsável pelo espalhamento dinâmico da luz viabilizando a análise de tamanho de partícula. A frequência do sinal é dependente do movimento, onde partículas menores se movem mais rapidamente dispersando menos luz do que partículas maiores, ou seja, está relacionado ao tamanho e forma da partícula dispersa no meio. Outra técnica importante, principalmente para soluções

coloidais é o potencial Zeta, a partir dele é possível determinar a carga superficial e prever a estabilidade pelas interações.

Através de simulações computacionais realizadas no site *Protein Data Bank* é possível estimar o raio da tripsina com as informações acerca de suas dimensões. A Figura 16 apresenta a enzima Tripsina globular com dimensões de 1,5 nm por 1,3 nm, com aproximado raio de 2 nm. É necessário salientar que essas dimensões desconsideram as dimensões de solvatação por moléculas de água presentes em solução.

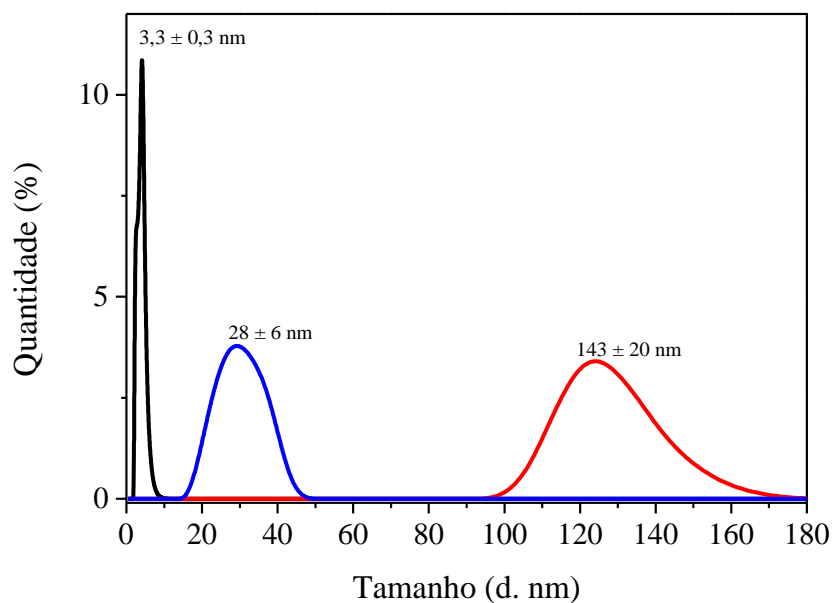
**Figura 16.** Dimensões da tripsina pelo modelo 1H4A.



Fonte: Próprio autor, PDB tripsina (1S0Q).

A partir das soluções de NPsAg, tripsina e NPsAg/Tri preparadas em meio tamponado, obteve-se a distribuição de tamanho a partir do espelhamento dinâmico de luz (EDL), observado na Figura 17, para a NPsAg (linha azul), para a tripsina (linha preta) e para NPsAg/Tri (linha vermelha).

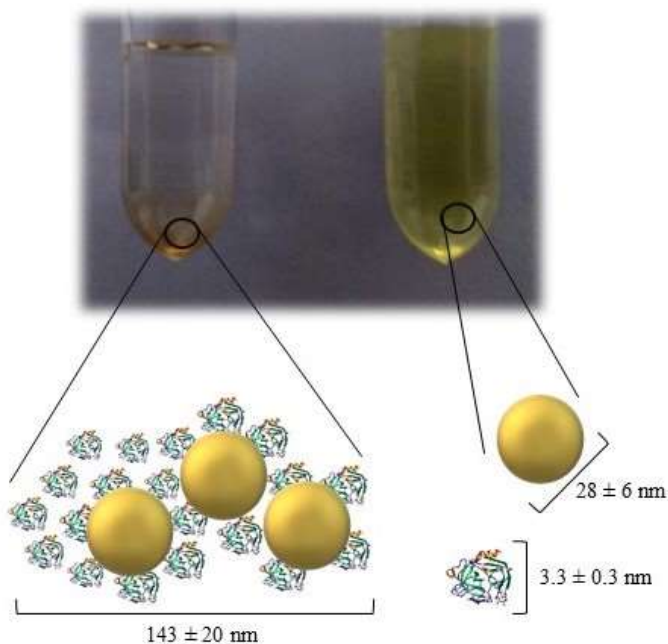
**Figura 17.** Distribuição de raio hidrodinâmico para NPsAg em azul, Tripsina em preto e NPsAg/Tri em vermelho, 50 mg/L em PBS 5 mmol/L, pH 7,4.



Fonte: Próprio autor.

Para as NPsAg o raio hidrodinâmico obtido através da média de 3 medidas com 100 varreduras de EDL foi de  $28 \pm 6$  nm, corroborando com a espectroscopia de UV-Vis. O raio hidrodinâmico da enzima foi de  $3,3 \pm 0,3$  nm, e para a NPsAg em presença da enzima foi de  $143 \pm 20$  nm, como é ilustrado no esquema da Figura 18.

**Figura 18.** Imagem das NPsAg/Tri (solução laranja) e NPsAg (solução amarela). Raios hidrodinâmicos para NPsAg/Tri, NPsAg e tripsina.

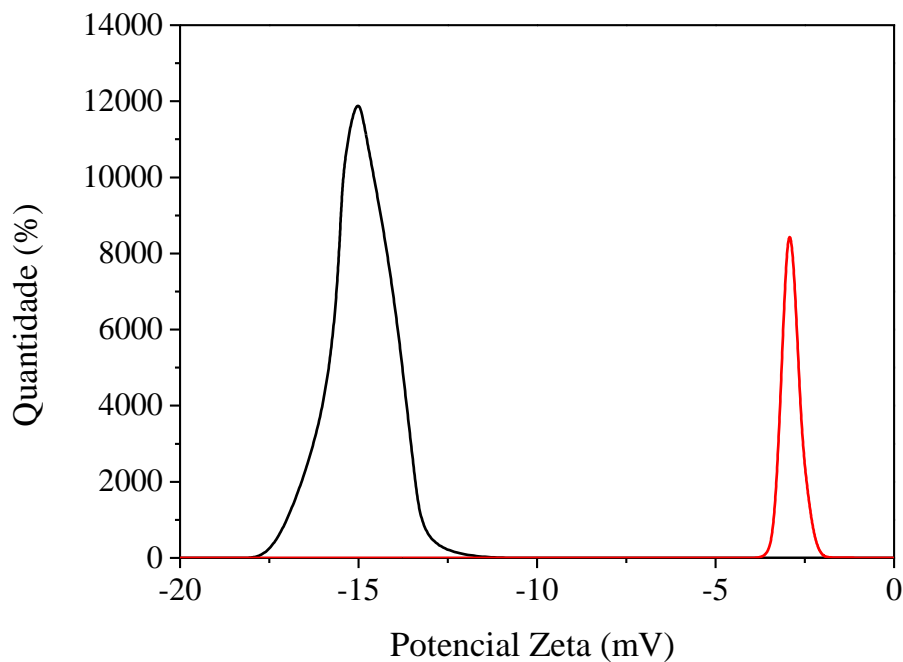


Fonte: Próprio autor.

Pela distribuição de tamanho da NPsAg, quanto da enzima tripsina esta concentração nota-se que estas não tendem a se aglomerar, assim ficando dispersas em solução. Pôr as NPsAg ao interagirem com as enzimas tentem a formar aglomerados, e essas interações diminuem a solubilidade da tripsina formando precipitado, visível na Figura 19.

O valor obtido de  $\zeta$  para as NPsAg é de  $-15 \pm 2$  mV, sendo um valor de estabilidade razoável que, em condições adequadas, coopera para a estabilidade da mesma ao longo do tempo. Entretanto para as NPsAg/Tri o valor de potencial zeta foi de  $-2,9 \pm 0,5$  mV, essa diminuição da carga é esperada, já que a tripsina possui carga líquida positiva de 6 (ProtParam<sup>50</sup>). Na presença de biomoléculas, tendem a formar uma camada para torná-las mais estáveis, diminuindo a estabilidade coloidal e formando precipitados, já que o valor de  $\zeta$  é mais próximo de zero, e não há cargas suficientes de repulsão que impeça a aglomeração.

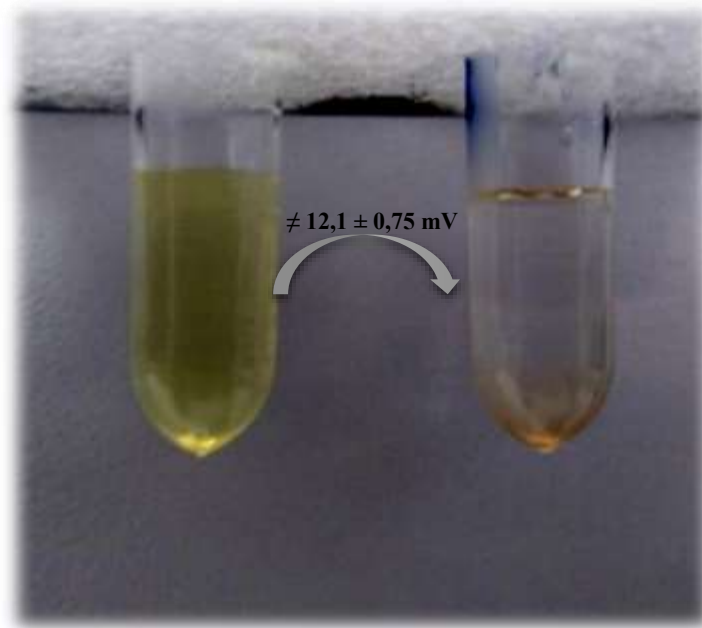
**Figura 19.** Potencial zeta para NPsAg (em preto) e NPsAg/Tri (em vermelho).



Fonte: Próprio autor.

Essa mudança de 12,1 mV da carga superficial da solução ocasiona a formação de precipitado, conforme Figura 20, pois as forças atrativas são maiores que as forças repulsivas, já que o  $\zeta$  está próximo de 0, não oferecendo estabilidade coloidal para essa solução.

**Figura 20.** Imagem das NPs<sub>Ag</sub>/Tri com corpo de fundo a esquerda e NPs<sub>Ag</sub> a direita pela mudança de Potencial Zeta.

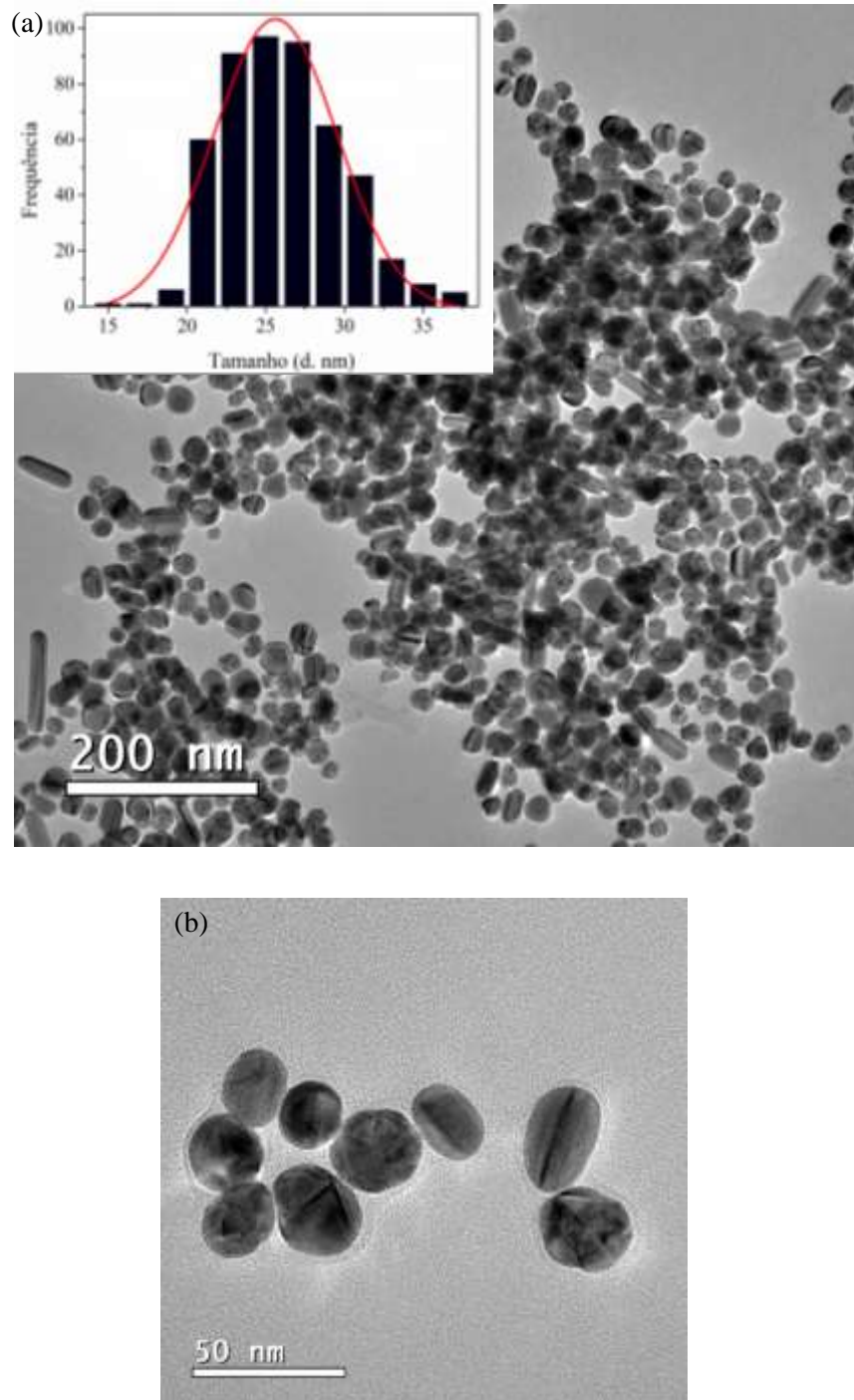


Fonte: Próprio autor.

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

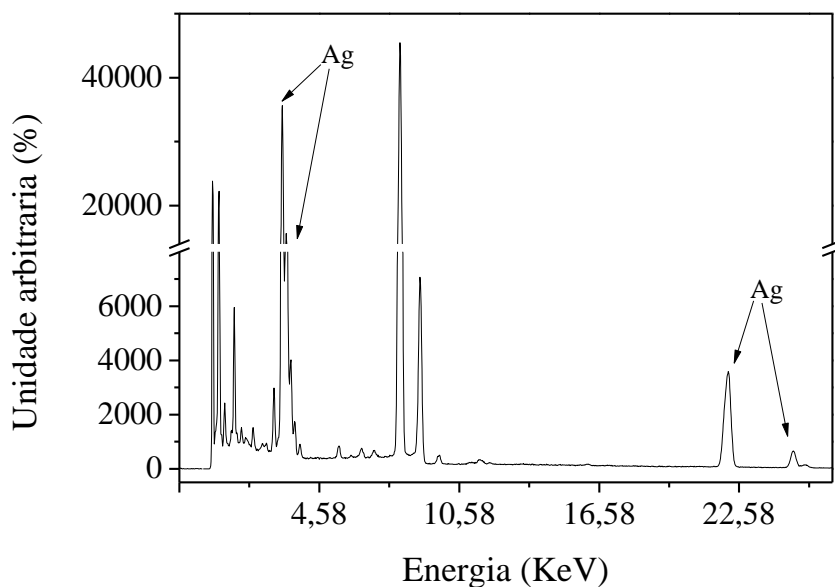
Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível obter informações morfológicas das nanopartículas de prata. Na Figura 21a observa-se NPs com diâmetro  $26 \pm 4 \text{ nm}$ , índice de polidispersividade de 0,16, sendo considerado monodispersas. A construção do histograma confirma o tamanho médio da distribuição dos diâmetros das NPs, conforme visualizado na Figura 21b. Nesta imagem de microscopia eletrônica de transmissão, é possível perceber que as nanopartículas possuem morfologia aproximadamente esférica. Para o EDS, desconsiderando o carbono e cobre da grade de suporte para as imagens, a quantidade quantificada pelo software do equipamento *Oxford instruments* foi de 95% de Ag, e que é representado pelos picos correspondentes próximos a  $k\alpha = 4,58$  e  $22,58 \text{ KeV}$  (Figura 22).

**Figura 21.** Histograma das NPsAg e imagem de MET (a), Imagem com maior ampliação de MET para NPsAg (b).



Fonte: Próprio autor.

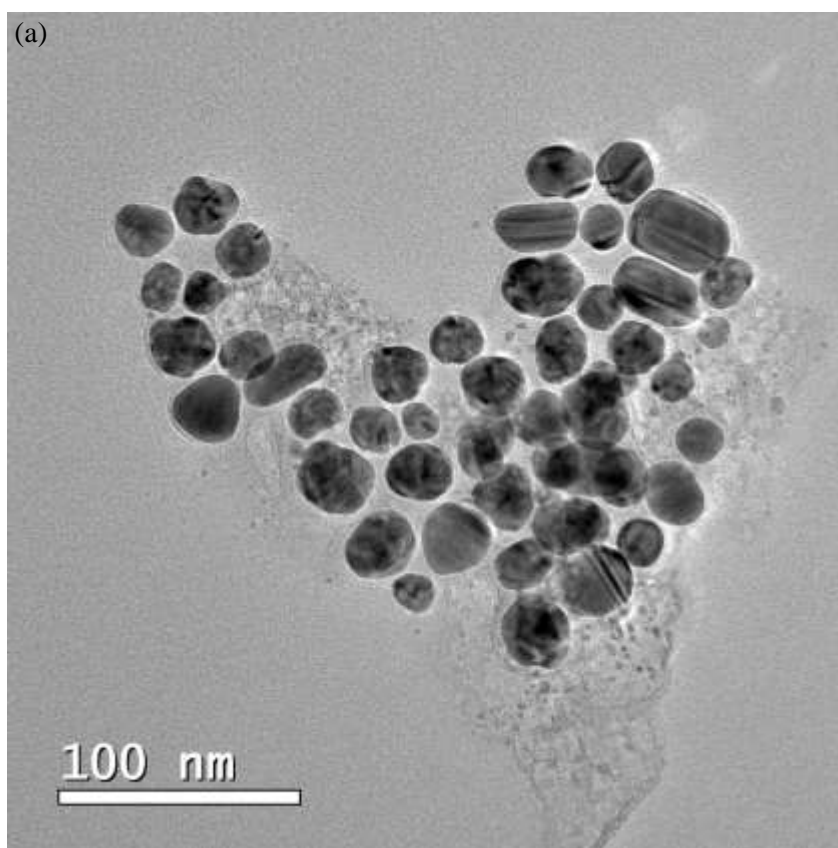
**Figura 22.** EDS para NPsAg sem a presença da enzima.

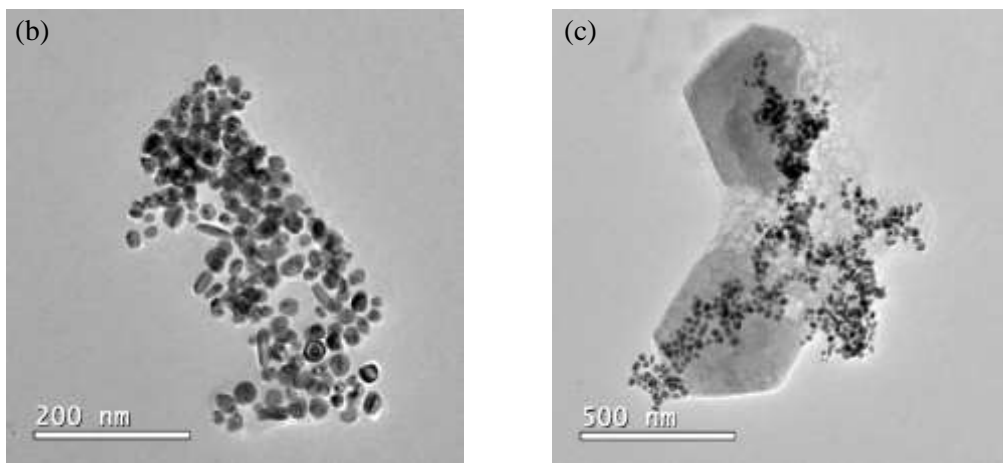


Fonte: Próprio autor.

Outras imagens de MET para o biosistema NPsAg/Tri também puderam revelar nitidamente que a enzima fica adsorvida na superfície das NPsAg, nas quais formam agregados de vários tamanhos, conforme indicado pelo espectro UV-Vis. Entretanto, não há uma mudança significativa de morfologia ou tamanho das NPsAg, conforme visualizado nas Figuras 23 a, b e c.

**Figura 23.** Imagem de MET de NPsAg/Tri (a), (b) e (c).

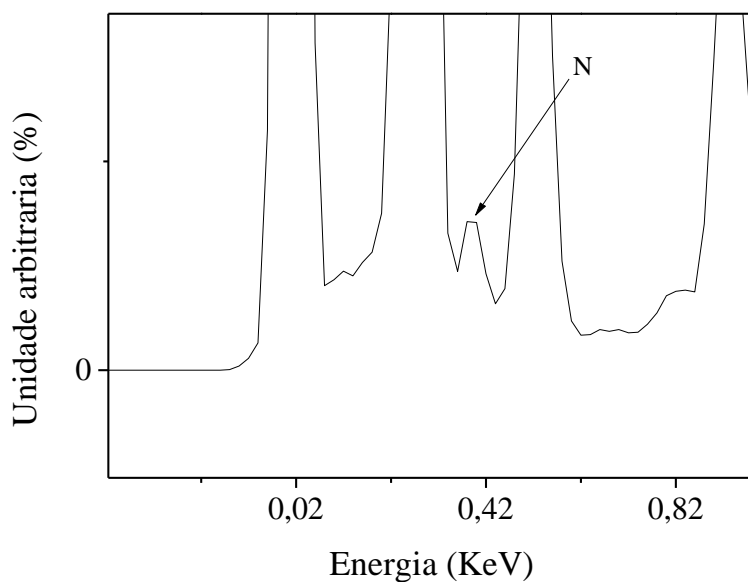




Fonte: Próprio autor.

Através do espectro de EDS para a NPsAg/Tri há a presença de nitrogênio (Figura 24), representando cerca de 14% em massa, em  $K\alpha = 0,42$  KeV, devido a presença da enzima, já que as enzimas têm em seus aminoácidos nitrogênios, os quais formam as ligações peptídicas. O mesmo pico não é observado para o sistema NPsAg.

**Figura 24.** EDS para NPsAg/Tri.

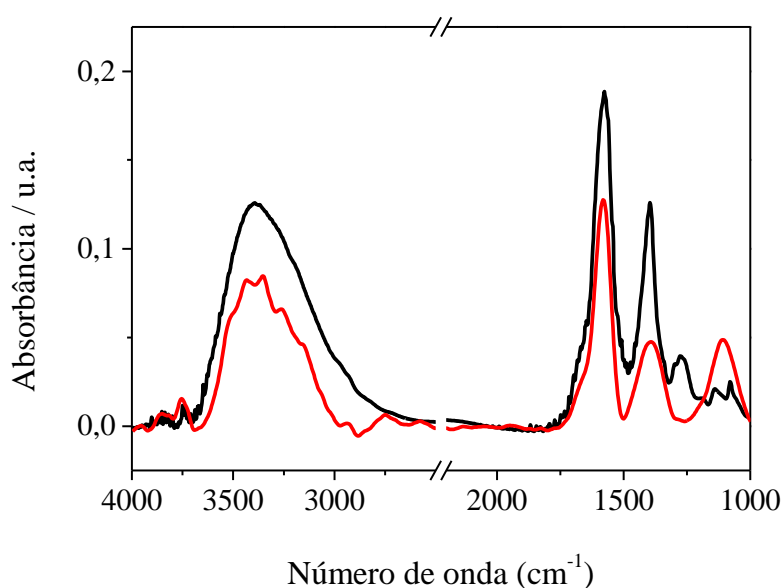


Fonte: Próprio autor.

#### 4.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho e Microscopia Óptica

Após a síntese das NPsAg foi realizada análise de FTIR (Figura 25) para a mesma que é estabilizada pelo citrato (em vermelho) e para a solução de TSC (em preto). Nesta Figura, de um modo geral, percebe-se que há um leve deslocamento dos modos vibracionais para a direita, muito provavelmente ocasionado pela interação do TSC com a NPsAg. Mas que o citrato está presente como estabilizante das NPsAg, e que as interações provavelmente ocorreram entre o TCS na superfície da NPsAg com a proteína.

**Figura 25.** Espectro de infravermelho por transformada de Fourier para Citrato trissódico (2mmol/L), linha preta e NPsAg estabilizada por Citrato (0,5 nmol/L), linha vermelha. As intensidades foram normalizadas para melhor comparação.



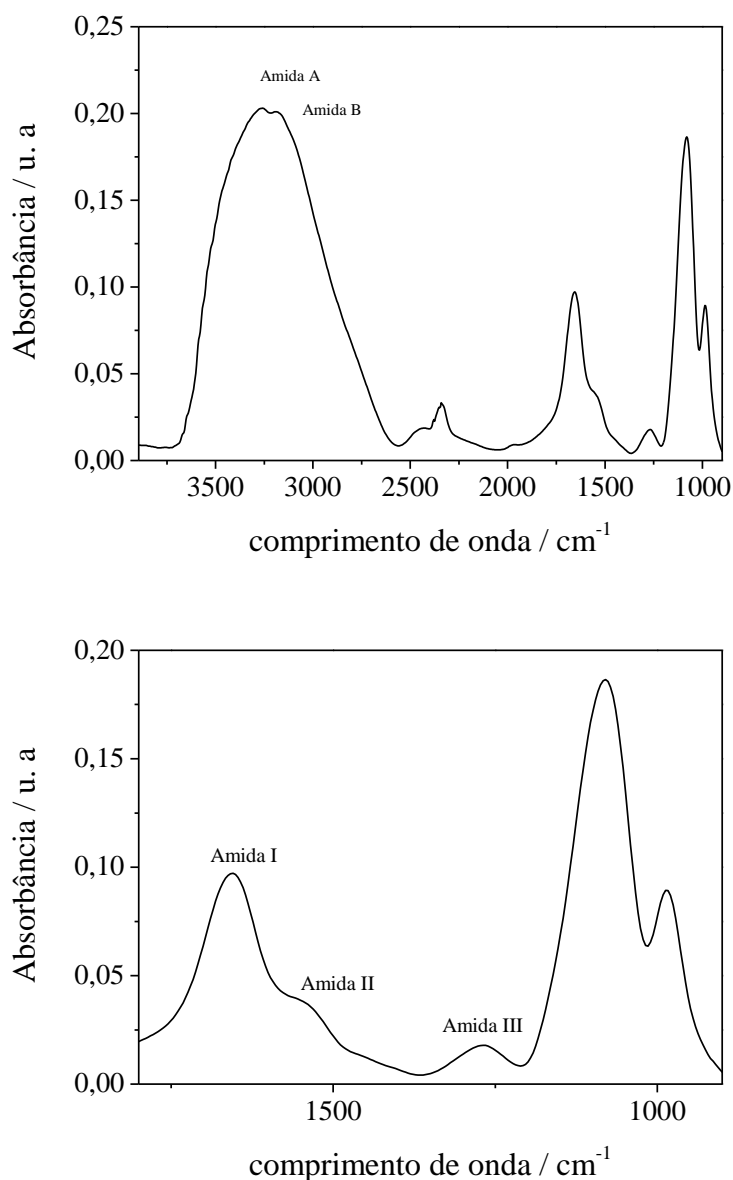
Fonte: Próprio autor.

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado para a determinação da estrutura secundária da enzima tripsina, já que esta técnica gera informações importantes através dos grupos peptídeos presentes nas proteínas. Essas bandas características da enzima são Amida A ( $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ ) e B ( $\sim 3100\text{ cm}^{-1}$ ), bandas geradas por ressonância de Fermi e pela vibração de alongamento da ligação N-H e que não depende da conformação proteica, indicadas da Figura 26a.

A banda do grupo Amida I ( $1600\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ ), de maior intensidade, é resultante principalmente da vibração de alongamento da ligação C=O acoplado com o estiramento da ligação C-N, e que está relacionado diretamente a conformação estrutura da proteína. A Amida II ( $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ ) é derivada da vibração de flexão angular da ligação N-H e

alongamento de C-N. Essas bandas de amida I e II estão presentes na Figura 26b, já a Amida III ( $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ ) possui bandas complexas geradas por misturas de deslocamento de coordenação dependendo do campo de força e cadeias laterais (BARTH, 2007; SUSI et al., 1986 e BANDEKAR, 1992).

**Figura 26.** Espectro de infravermelho por transformada de Fourier para enzima Tripsina, (a) na região de  $3800\text{ cm}^{-1}$  a  $900\text{ cm}^{-1}$  e (b) na região de  $1800\text{ cm}^{-1}$  a  $900\text{ cm}^{-1}$ .



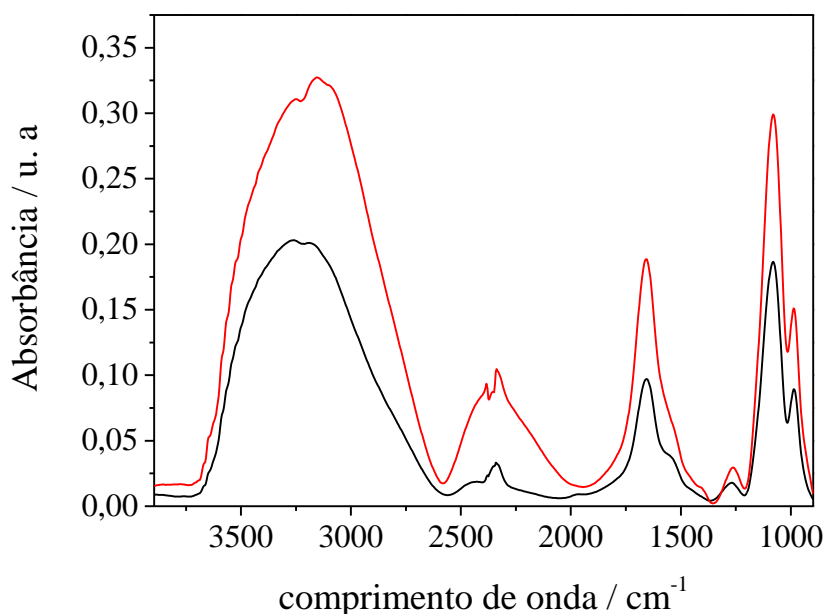
Fonte: Próprio autor.

Desta forma realizou-se as medidas de FTIR para a tripsina e para NPsAg/Tri, essa técnica juntamente com as nanopartículas de prata, ouro e platina por exemplo apresentam vantagens pois depende da ressonância de plasmon de superfície localizada, para o efeito SEIRA, com o a intensificação do sinal, potencializando as aplicações com esses tipos de

nanomaterial. As NPsAg vêm se tornando um nanomaterial verde pelas diversas formas de síntese, para as mais diferentes utilizações em detecção e na utilização de biossensores, tornando mais sensíveis para estudo de estruturas de carbono do que a técnica convencional (Eid et al., 2020).

No espectro de infravermelho, Figura 27, existe uma intensificação do sinal em todas as regiões de varredura, mas efeito SEIRA fica mais pronunciado na região da Amida I, onde o sinal aumenta cerca de 50%. Ocorrendo a mudança nas posições dos picos das bandas de amida I em 1656 para 1651  $\text{cm}^{-1}$  e amida II 1543 para 1541  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 27.** Espectro de infravermelho por transformada de Fourier para enzima Tripsina  $1.10^{-5}$  mol/L, em preto, NPsAg/Tri, em, vermelho.



Fonte: Próprio autor.

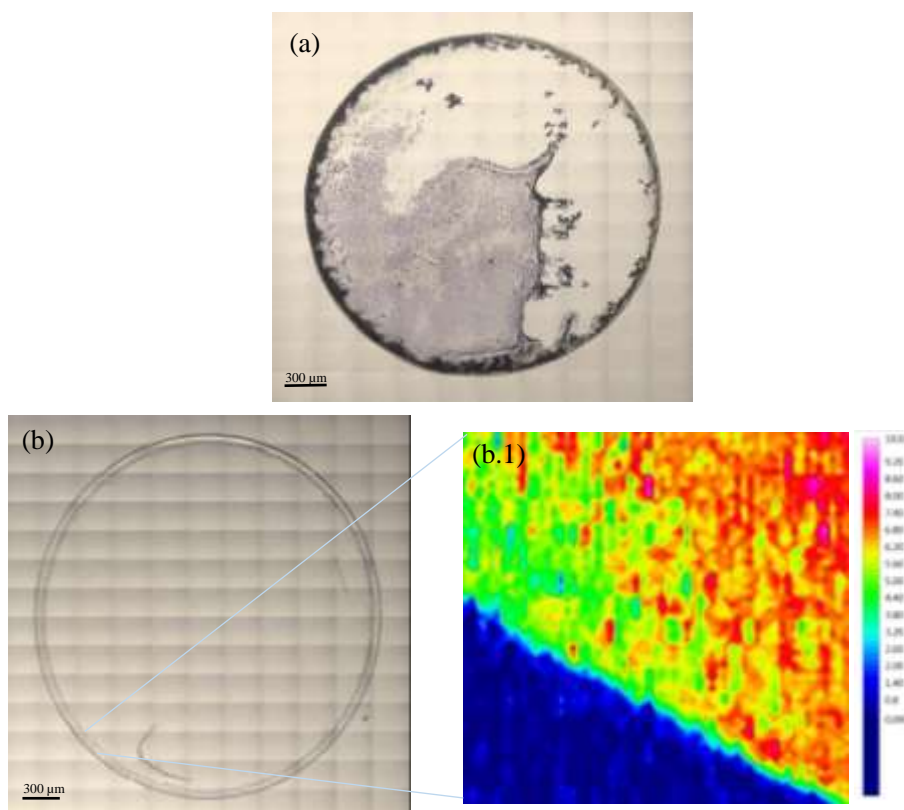
Com a proteína depositada no substrato de  $\text{CaF}_2$ , que não absorve no infravermelho usado como suporte para colocar a amostra, foi feita imagem com microscópio (Figura 28 a), e com a análise de FTIR com detector FPA integrando a região de 1600  $\text{cm}^{-1}$  a 1690  $\text{cm}^{-1}$  foram gerados os mapeamentos químicos (Figura 28 b e c), nos quais nota-se que proteína é hidrofílica, já que apresenta a maior concentração nas bordas.

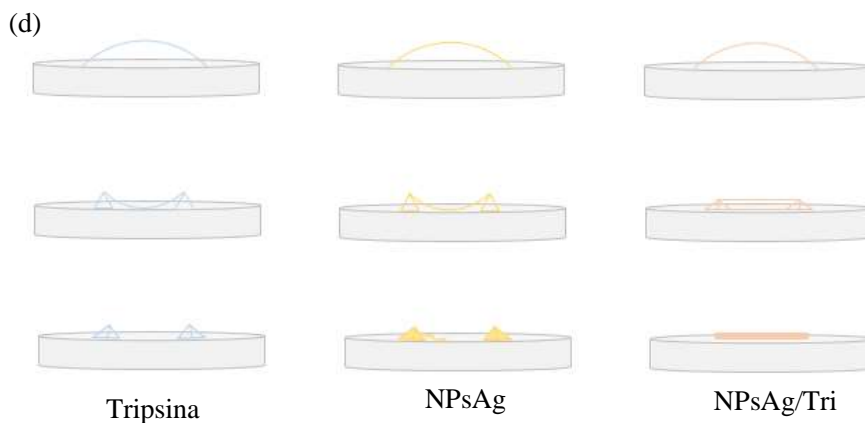
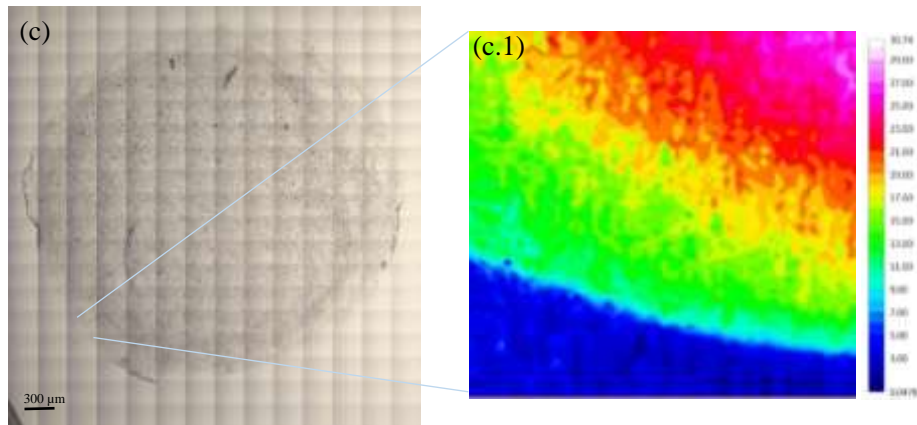
Esse comportamento é notado como um padrão na secagem de uma gota contendo partículas suspensas em um substrato. Esse padrão de deposição é encontrado não apenas para soluções de proteínas, DNA, soluções salinas, e mesmo para nanopartículas. Conduzir a evaporação de uma solução depositada tem vários usos práticos como diagnóstico de doenças,

revestimento de superfície cristalização bidimensional e biossensores de proteínas. O conhecido padrão de *coffee ring* ocorre devido ao movimento de partículas em direção as bordas. A evaporação nas bordas de uma gota é maior quando comparado ao centro da mesma. Esse padrão de deposição depende de muitos fatores como tamanho de partícula, tamanho de gota, natureza da superfície do substrato, formas das partículas, presença de surfactante e aditivos, temperatura do substrato (MA et al., 2011; PRADHAN et al., 2015).

Esse comportamento de *coffee ring* está presente não só para a tripsina, mas também para a nanopartícula de prata, o qual a maior concentração é nas bordas, por estar depositado em um substrato hidrofóbico em uma solução aquosa, as amostras interagem mais com seu solvente, mas para as NPsAg/Tri esse comportamento é minimizado, pela microscopia na Figura 28 c a deposição fica mais uniforme, uma vez que ao interagir as NPsAg a tripsina sua solubilidade diminui o que provavelmente aumente suas interações hidrofóbicas com o substrato, o que proporciona o filme mais uniforme, que são visíveis nos mapas químicos de superfície 28 b.1 e 28 c.1 e esquematizado na Figura 28 d.

**Figura 28.** Imagem de microscopia para NPsAg (a), Tri (b) e NPsAg/Tri (c), mapa químico de superfície Tri (b.1) e NPsAg/Tri (c.1) esquema de *coffee ring* (d).

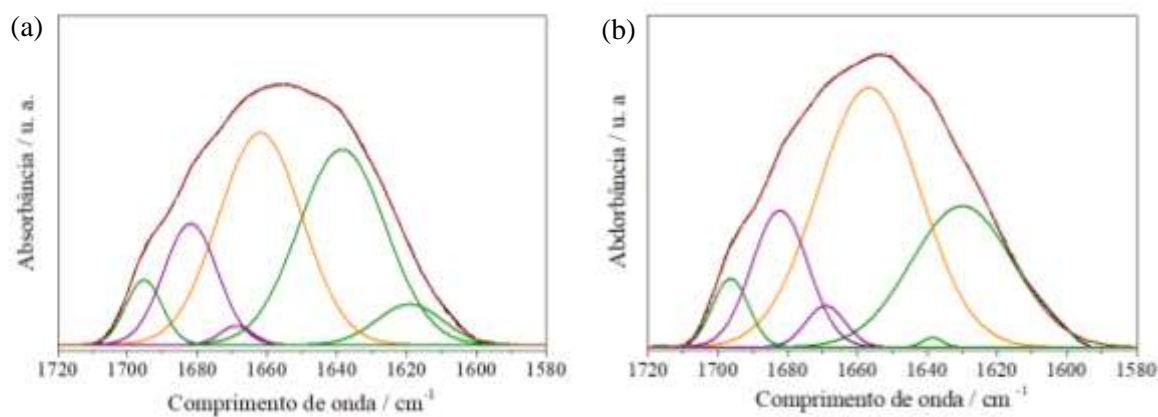
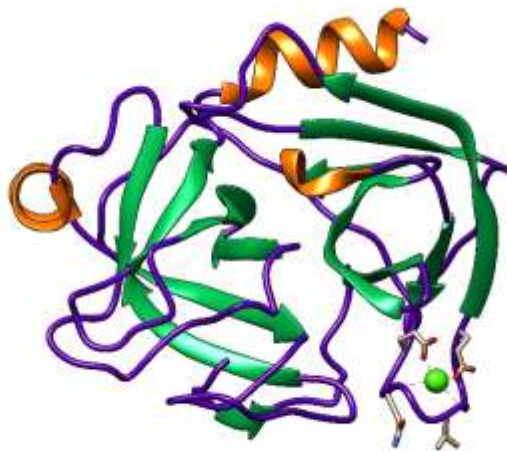




Fonte: Próprio autor.

Através dos 4096 espectros gerados com o detector FPA, em cada mapa química, foi tirado uma média por meio do método da segunda derivada, foi feita a deconvolução da região de amida I e a determinação da estrutura secundária da proteína para a tripsina e NPsAg/Tri, conforme Tabela 4 e Figura 29. A maioria dos métodos para determinação da estrutura secundária utilizados por FTIR é concentrada na análise da banda de Amida I, porque é composta por cerca de 80% pela vibração C=O da ligação peptídica, sendo que uma forma de analisar essa banda é pela decomposição da mesma em seus constituintes, conforme as Figuras 30 (a) e (b). A tripsina é majoritariamente Folha- $\beta$  (KONG et al., 2007), ao interagir com a nanopartícula ocorre uma mudança de sua estrutura secundária, pela diminuição de estrutura ordenada, o que pode ser devido a interações do tipo eletrostática, já que as nanopartículas possuem carga superficial negativa e, além dos resíduos positivos presente na enzima, podem ocorrer interações do tipo dipolo, o que reforça essa indicação são que as NPsAg interagem com os grupos C=O e C—N, da amida I e II, dos polipeptídios da proteína, o que gera um rearranjo na rede de ligações de hidrogênio no grupo carbonil.

**Figura 29.** Estrutura secundária da tripsina,  $\alpha$ -Hélice em laranja, Folha- $\beta$  em verde e Random coil em roxo. Deconvolução de Amida I para a enzima tripsina, (a) para a região de mapa químico b, (b) região de mapa químico d.



Fonte: Próprio autor, PDB tripsina (1S0Q).

**Tabela 04.** Estrutura secundária da proteína por FTIR.

	Folha- $\beta$ (%)	Outros (%)
Tripsin (FTIR) (KONG, 2007)	44	56
Tripsin (FTIR) <sup>a</sup>	46,9	53,1
Tripsin (FTIR) <sup>b</sup>	32,4	67,6

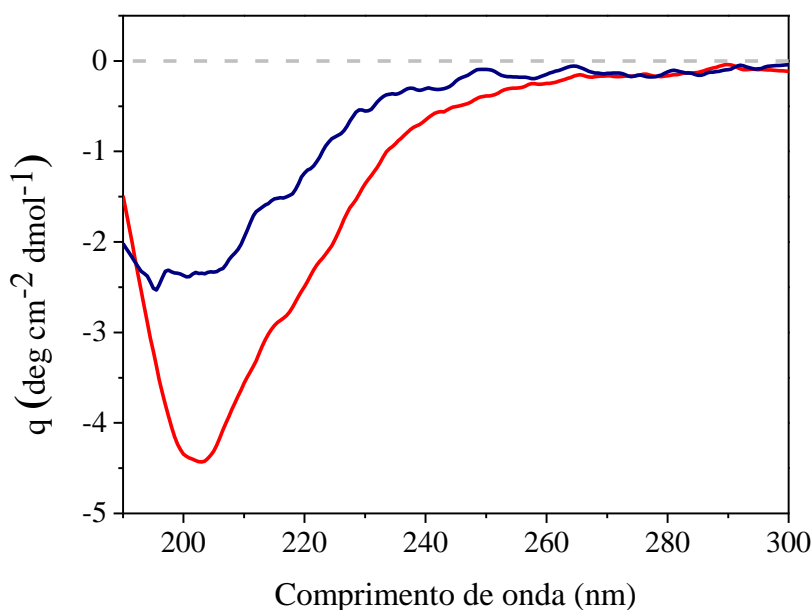
Fonte: Próprio autor.

## 4.6 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular pelo desvio da luz polarizada a partir de ligações peptídicas, como dos cromóforos, fornece informações sobre a estrutura secundária de proteínas. A Figura 30 mostra o espectro de dicroísmo para a enzima tripsina e NPsAg/Tri, desprovido de picos positivos, apresentado uma banda negativa na região ultravioleta em cerca de 203 nm. Ao serem adicionadas NPsAg ocorre a mudança da forma e intensidade do pico no espectro de DC, ocorrendo alteração de sua estrutura básica após interação com NPsAg, o que complementa que a estrutura secundária é desdobrada.

Pelo método da deconvolução utilizando o site *bestesl – single spectrum analysis results*, obteve-se as porcentagens da constituição da estrutura secundária da enzima destes espectros, conforme Tabela 5. Mas em meio aquoso o resultado da mudança estrutural é alterado, se comparado ao FTIR, ocorre o decréscimo da porcentagem de  $\alpha$ -Hélice, o que deve ser ocasionado pelas interações das Amidas I e II com a nanopartícula. Entretanto aumenta a estrutura beta. A ligação das nanopartículas de prata leva à transição alfa-beta, o que pode estar relacionado a maior liberdade conformacional e interação hidrofílica com o meio.

**Figura 30.** Espectro de dicroísmo circular a 25°C para tripsina  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L e NPsAg/Tri em tampão PBS 5 mmol/L, pH 7.4.



Fonte: Próprio autor.

**Tabela 05.** Estrutura secundária para tripsina por dicroísmo circular.

	Folha- $\beta$ (%)	$\alpha$ -Hélice (%)	Random coil (%)
Tripsina	25	14	64
NPsAg/Tri	26	11	66

Fonte: Próprio autor.

## 5 Conclusões

É um importante campo de estudo o comportamento de nanomateriais na presença de biomoléculas para aplicação *in vivo*, bem como no uso de biossensores. Por meio da síntese de NPsAg pelo método de co-redução química com duas etapas de temperaturas formou nanopartículas de tamanho controlado e morfologia próxima a esférica, de  $26 \pm 4$  nm.

As imagens de MET confirmaram a morfologia e tamanho das NPs, as quais apresentam banda plasmônica referente em 407 nm na espectroscopia de UV-Vis.

As NPsAg, ao interagir com a enzima, mudaram sua característica do espectro de UV-Vis, tornando menos intenso e mais alargado, ocorrendo um deslocamento para o vermelho, indicando agregação desta solução coloidal, e diminuição da estabilidade, devido as interações do tipo eletrostática e hidrofobia. O que é confirmado por EDL ao aumentar o raio hidrodinâmico de  $28 \pm 6$  nm para  $143 \pm 20$  nm, com baixa solubilidade pelo potencial zeta próximo de zero. Essa interação ocasiona mudança da estrutura da proteína, diminuindo a organização da estrutura secundária.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S., MUKHERJI, S., MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5 – 100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 3974 - 3983, 2014.

ANTÃO, C. M., MALCATA, F. X. Plant serine proteases: Biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 637 – 650, 2005.

ARNOLD, M. A., SMALL, G. W. Noninvasive Glucose Sensing. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 5429 – 5439, 2005.

ARRONDO, J. L. R., GONI, F. M. Structure and dynamic of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. v. 72, p. 367, 1999.

ATAKA, K. I., YOTSUYANAGI, T., OSAWA, M. Potential-Dependent Reorientation of Water Molecules at an Electrode/Electrolyte Interface Studied by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100 (25), p. 10664 –10672, 1996.

BABU, S., CLAVILLE, M. O. GHEBREYESSUS, K. Rapid synthesis of highly silver nanoparticles and its application for colourimetric sensing of cysteine. **Journal of experimental Nanoscience**, v. 10, p. 1242 – 1255, 2015.

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

BANDEKAR, J. Amide modes and protein conformation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1120, n. 2, p. 123 - 143, 1992.

BARBALINARDO, M.; CAICCI, F.; CAVALLINI, M.; GENTILI, D. Protein Corona Mediated Uptake and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Mouse Embryonic Fibroblast. **Small**. v. 14 (34), p. 1801219 - 1801226, 2018.

- BARRETT, A. J. **Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases**. v. 244, 765 p., 1994.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, v. 1767 (9), p. 1073 - 1101, 2007.
- BERTUCCI, C., PISTOLOZZI, M., DE SIMONE, A. Circular dichroism in drug discovery and development: an abridged review. **Analytical and bioanalytical Chemistry**. v. 398, p. 155 - 166, 2010.
- BEYCHOK, S. Circular dichroism of biological macromolecules. **Science**. v. 154, p. 1288 - 1299, 1966.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. **Journal of controlled release**, v. 235, p. 337 – 351, 2016.
- BJERKE, A. E., GRIFFITHS, P. R. Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of p-Nitrothiophenol on Vapor-Deposited Platinum Films. **Applied spectroscopy**. 56 (10), p. 1275 –1280, 2002.
- BORN, M. W. E. **Principles of optics**. 6th. Ed. Oxford, England: Cambridge University Press, 1980.
- CAPJAK, I., GORETA, S. S., JURASIN, D. D., VRCERK. I. V. How protein coronas determine the fate of engineered nanoparticles in biological environment. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 68 (4), p. 253 – 259, 2017.
- CHEN, H., FANG, A., ZHANG, Y., YAO, S. Silver triangular nanoplates as an high efficiently FRET donor-acceptor of upconversion nanoparticles for ultrasensitive “Turn on-off” protamine and trypsin sensor. **Talanta**, v. 174, p. 148 – 155, 2017.
- CONSTANTINO, M. G. **Química orgânica: curso básico universitário**. Rio de Janeiro: LTC, 512 p., 2008.
- DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation. **Biochemistry**, v. 30 (43), p. 10363 - 10370, 1991.

DURÁN, N., DE MORAIS, P. C., MATTOSO, L. H. C. **Nanotecnologia – introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 208 p., 2006.

DURÁN, N., ROLIM, W. R., DURÁN, M., FÁVARO, W. J., SEABRA, A. B. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**. v. 42 (2), p. 206 - 213, 2019.

DURÁN, N., SILVEIRA, C. P., DURÁN, M., MARTINEZ. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. **Nanobiotechnol.** v. 13 (55), p. 1 – 17, 2015.

DVORAK, J., HORN, M. Serine proteases in schistosomes and other trematodes. **International Journal for Parasitology**, v.48 (5), p. 333 - 344, 2018.

EID, S. M., KELANI, K. M., BADRAN, O. M., REZK, M. R., ELGHOBASHY, M. R. Surface enhanced infrared absorption spectroscopy (SEIRA) as a green analytical chemistry approach: Coating of recycled aluminum TLC sheets with citrate capped silver nanoparticles for chemometric quantitative analysis of ternary mixtures as a green alternative to the traditional methods. **Analytica chimica acta**. v. 1117, p. 60 – 73, 2020.

EID, S. M., SOLIMAN, S. S., ELGHOBASHY, M. R., ABDALLA, O. M. ATR-FTIR coupled with chemometrics for quantification of vildagliptin and metformin in pharmaceutical combinations having diverged concentration ranges. **Vibrational spectroscopy**, v. 106, p. 102995 - 103003, 2020.

EID, S., EL-RAHMAN, M., ELGHOBASHY, M., KELANI, K. Attenuated Total Reflectance Fourier Transformation Infrared spectroscopy fingerprinted online monitoring of the kinetics of circulating Butyrylcholinesterase enzyme during metabolism of bambuterol. **Analytica Chimica Acta**, v. 1005, p. 70-80, 2018.

EVANOFF, D. D., CHUMANOV, G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. **Chemphyschem**, v. 6 (7), p. 1221 - 1231, 2005.

EVANS, D. F., WENNERSTROM, H, **The colloidal domain: where physics, chemistry, biology and technology meet**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 1999.

- FASMAN, G. D. **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. New York, Springer, p. 738, 1996.
- FRATTINI, A., PELLEGGRI, N., NICASTRO, D., SANCTIS, O. Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. **Materials Chemistry and Physics**. v. 94 (1), p. 148 - 152, 2005.
- FURLANI, I., AMARAL, B., OLIVEIRA, R., CASS, Q. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, v. XY (00), p. 1-11, 2020.
- GEONMONOND, R. S., SILVA, A. G. M. D., CAMARGO, P. H. C. **Controlled synthesis of noble metal nanomaterials: motivation, principles, and opportunities in nanocatalysis**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 719 - 744, 2018.
- GERHARTZ, W. **Enzymes in industry. Production and applications**. Basel (Switzerland). VCH: p. 321, 1990.
- GOMES, W. S., SILVA, U. L. V., SOUZA J. P. I. Influência do método de preparação de eletrocatalisadores PTRU/C sobre a atividade catalítica frente à reação de oxidação de etanol em meio ácido. **Química Nova**, v. 36 (4), p. 507 - 512, 2013.
- HARTSTEIN, A., KIRTLEY, J., TSANG, J. Enhancement of the infrared absorption from molecular monolayers with thin metal overlayers. **Physical Review Letters**, v. 45, p. 201 – 204, 1980.
- HIROSE, A. L. S. **Estudo da extração de tripsina em sistemas de duas fases aquosas numa micro coluna**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2001.
- HOWES, P. D., CHANDRAWATI, R., STEVENS, M. M. Colloidal nanoparticles as advanced biological sensors. **Science**, v. 346 (6205), p. 1247390, 2014.
- HUNTER, R. J. **Zeta Potential In Colloid Science: Principles And Applications**. Academic Press, UK, 341 p., 1998.
- IRAVANI, S., VARMA, R. S. Biofactories: engineered nanoparticles via genetically engineered organisms. **Green Chemistry**. v. 21 (17), p. 4583 - 4603, 2019.

JEEVANANDAM, J., BARHOUM, A., CHAN, Y. S., DUFRESNE, A., DANQUAH, M. K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**. v.9 (1), p. 1050 - 1074, 2018.

KANNAN, R. M., NANCE, E., KANNAN, S., TOMALIA, D. A. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: From design principles to clinical applications. **Journal of Internal Medicine**. v. 276, p. 579 – 617, 2014.

KHAN, I., SAEED, K., KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities **Arabian Journal of Chemistry**. v. 12 (7), p 908 -931, 2019.

KISS, F. D., MIOTTO, R., FERRAZ, A. C. Size effects on Silver nanoparticles properties. **Nanotechnology**, v. 22 (27), p 275708 - 275717, 2011.

KONG, J., YU, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39 (8), p. 549 – 559, 2007.

KREIBIG, U., VOLLMER, M. **Optical properties of metal clusters**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1995.

LACERDA, C. D., **Caracterização físico-química da isoforma  $\gamma$ -tripsina bovina**. Vitória, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia – UFES. Dissertação de Mestrado. Vitória, Espírito Santos, 2014

LANGER, J., NOVIKOV, S. M., LIZ-MARZÁN, L. M. Sensing using plasmonic nanostructures and nanoparticles. **Nanotechnology**, [s.l.], v. 26 (32), p. 1- 28, 2015.

LEE, S. H., JUN, B. H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **Int J Mol Sci**. v. 20 (4), p 865 - 875, 2019.

LEE, S. H., JUNG, H. K., KIM, T. C., KIM, C.H., SHIN, C. H., YOON, T., HONG, A., JANG, H. S., KIM, D. H. Facile method for the synthesis of gold nanoparticles using an ion coater. **Applied Surface Science**. v. 434, p. 1001 - 1006, 2018.

LESK, A. M. **Evolution in selected proteins families**. In: **Introduction to Protein Architecture**. Oxford Uni ed. Oxford: [s.n.]. p. 204 - 216, 2001.

LI, X., YANG, Z., PENG, Y. The interaction of silver nanoparticles with papain and bromelain. **New Journal of Chemistry**. v. 42 (7), p 4940 - 4950, 2018.

LINK, S., BURDA, C., WANG, Z. L., EL-SAYED, M. A. Electron dynamics in gold and gold–silver alloy nanoparticles: The influence of a nonequilibrium electron distribution and the size dependence of the electron–phonon relaxation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 111(3), p.1255 – 1264, 1999.

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**. v. 40 (6), p. 372 - 382, 2012.

LU, Y., MEI, Y., SCHRINNER, M., BALLAUFF, M., MÖLLER, M.W., BREU, J. In Situ Formation of Ag Nanoparticles in Spherical Polyacrylic Acid Brushes by UV Irradiation. **Journal of Physical Chemistry C**. v. 111 (21), p. 7676 - 7681, 2007.

LYNCH, I., DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions. **Nanotoday**. v. 3 (1), 40 - 47, 2008.

MA, H., HAO, J. Ordered patterns and structures via interfacial self-assembly: superlattices, honeycomb structures and coffee rings. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, p. 5457 – 5471, 2011.

MA, X., GEISER-LEE, J., DENG, Y., KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the Total Environment**. v. 408 (16), p. 3053 - 3061, 2010.

MAIER, S. A. **Plasmonics: Fundamentals and Applications**. Springer, 2007.

MAYERHÖFER, T., POPP, J. Periodic array-based substrates for surface-enhanced infrared spectroscopy. **Nanophotonics**, v. 7, p. 39 – 79, 2018.

MICHNA, A., MORGA, M., ADAMCZYK, Z., KUBIAK, K. Monolayers of silver nanoparticles obtained by green synthesis on macrocation modified substrates. **Materials chemistry and physics**, v. 227, p. 224 – 235, 2019.

MULFINGER, L., SOLOMON, S. D., BAHADORY, M., JEYARAJASINGAM, A. V., RUTKOWSKY, S. A., BORITZ, C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **J. Chem. Educ.** v. 84 (2), p. 322 - 334 , 2007.

- MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. **Langmuir**, v. 12 (3), p. 788, 800, 1996.
- MUTHU, S., GOPAL, V. B., SOUNDARARAJAN, S., NATTARAYAN K., NARAYAN, K. S., LAKSHMIKANTHAN, M., MALAIRAJ, S., PERUMAL P. Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and Characterization. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 112, p. 161 - 172, 2017.
- NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 189-198 p., 2014.
- PACIONI, N. L., BORSARELLI, C. D., REY, V., VEGLIA, A. V. **Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles: A Mechanistic Perspective. Silver Nanoparticle Applications. Fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices**. Springer, Capítulo 2, p. 13 - 46, 2015.
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. A. Introduction to spectroscopy. **Belmont: Thomson Learning**, p. 680, 2009.
- PRADHAN T. K., PANIGRAH, K. P. Deposition pattern of interacting droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 562 – 567, 2015.
- RAWLINGS, N. D., BARRETT, A. J., BATEMAN, A. Asparagine Peptide Lyases a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286 (44), p. 38321 – 38328, 2011.
- ROY, U., RODRIGUEZ, J., BARBER, P., DAS NEVES, J., SARMENTO, B., NAIR, M. The potential of HIV-1 nanotherapeutics: From in vitro studies to clinical trials. **Nanomedicine**, v. 10, p. 3597–3609, 2015.
- SHARMA, A., SHARMA, S., SHARMA, K., CHETRI, S., VASHISHTHA, A., SINGH, P., KUMAR, R., RATHI, B., AGRAWAL, V. Algae as crucial organisms in advancing nanotechnology: a systematic review. **Journal of Applied Phycology**. v. 28 (3), p. 1759 - 1774, 2016.
- SIGNORI, A. M. **Desenvolvimento de uma Nova Metodologia para Preparação de Nanopartículas de Prata Estabilizadas pela Polietilenoimina Funcionalizada e Aplicação**

**em Catálise.** Programa de Pós-Graduação em Química – UFSC. Dissertação de Mestrado, Florianópolis, 2010.

SUREWICZ, W. K., MANTSCH, H. H., CHAPMAN, D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. **Biochemistry**, v. 32 (2), p. 389 - 394, 1993.

SUSI, H., BYLER, D. M. Resolution-enhanced Fourier-transform infrared-spectroscopy of enzymes. **Methods in enzymology**, v. 130, p. 290-311, 1986.

THORLEY, A. J.; TETLEY, T. D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 140, p. 176 – 185, 2013.

TREUEL L, NIENHAUS G. Toward a molecular understanding of nanoparticle-protein interactions. **Biophysical Reviews**, v. 4 (2), p. 137 – 147, 2012.

TSAI, T. C., LIU, C. W., WU, Y. C., ONDEVILLA, N. A. P., OSAWA, M., CHANG, H. C. In situ study of EDC/NHS immobilization on gold surface based on attenuated total reflection surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (ATR-SEIRAS). **Colloids and surfaces, B, Biointerfaces**, v. 175, p. 300 – 305, 2019.

UNMÜSSIG, T., DAUBINGER, P., WELTIN, A., URBAN, S., URBAN G., KIENINGER, J. Non-enzymatic glucose sensing based on hierarchical platinum micro-/nanostructures. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 816, p 215-222, 2018.

VARNER, K. U.S. **Environmental Protection Agency Office of Research and Development. State of the science literature review: everything nanosilver and more. Scientific, technical, research, engineering and modeling support final report.** Disponível em: <http://www.epa.gov/chemicalresearch/research-evaluating-nanomaterials-chemical-safety> . Acesso em: 12 dez. 2020. Washington (DC), 2010.

WAGHMARE, M., KHADE, B., CHAUDHARI, P., DONGRE, P. Multiple layer formations of bovine serum albumin on silver nanoparticles revealed by dynamic light scattering and spectroscopic techniques. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 20 (7), p. 1 - 21, 2018.

WALKEY, C. D., OLSEN, J. B., SONG, F., LIU, R., GUO, H., OLSEN, D. W. H., COHEN, Y., EMILI, A., CHAN, W. C. W. Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cellular Interaction of Gold and Silver Nanoparticles. **ACS Nano**. v. 8 (3), p. 2439 - 2455, 2014.

WANG, G., LU, Y., HOU, H., LIU, Y. Probing the binding behavior and kinetics of silver nanoparticles with bovine serum albumin. **RSC Advances**, v. 7 (15), p. 9393 – 9401, 2017.

WU, X., WANG, J., WANG S., WU F., CHEN, Z., LI1, C., CHENG G., XIAO-FENG F. Inhibition of Influenza A Virus Replication by TRIM14 via Its Multifaceted Protein–Protein Interaction With NP. **Frontiers Microbiol**, v. 10, p. 344, 2019.

XIA, Y. N., HALAS, N. J. Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures. **MRS Bulletin**, v. 30, n. 5, 338-344, 2005.

ZANGANEH, S., SPITLER, R., ERFANZADEH, M., MAHMOUDI, M. Protein Corona: Opportunities and Challenges. **The international journal of biochemistry & cell biology**. v. 75, p. 143 - 147, 2016.

ZHANG, L., ZHANG, J., ZENG, G., DONG, H., CHEN, Y., HUANG, C., ZHU, Y., XU, R., CHENG, Y., HOU, K., CAO, C., FANG, W. Multivariate relationships between microbial communities and environmental variables during co-composting of sewage sludge and agricultural waste in the presence of PVP-NPsAg. **Bioresource technology**. v. 261, p. 10 - 18, 2018.