

Síntese e estabilização de nanopartículas de ouro associadas a um peptídeo e preparadas pela β -glucana como agente redutor

Gabriela Cristina Mendonça Calisto⁽¹⁾, Rafael Marques⁽²⁾, Humberto de Mello Brandão⁽³⁾, Michelle Daiane de Almeida Loures⁽⁴⁾, Marcelo Porto Bemquerer⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: gabikalisto@gmail.com

Resumo — As nanopartículas de ouro funcionalizadas com peptídeos são comumente sintetizadas devido à estabilidade físico-química dos peptídeos e à facilidade de obtenção pela síntese em fase sólida. O peptídeo escolhido para funcionalização das nanopartículas tem a seguinte sequência de resíduos de aminoácido: H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂, no qual o resíduo de cisteína (C) faz a ligação do peptídeo ao ouro metálico e o resíduo de histidina (H) é o sítio principal de ligação de íons Cu²⁺. Ademais, este estudo busca promover a biossíntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) usando β -glucana com o objetivo de investigar o processo de estabilização coloidal das nanoestruturas metálicas. As β -glucanas atuam como redutores e estabilizadores que induzem a formação de AuNPs na superfície externa da própria β -glucana. As nanopartículas de ouro obtidas e modificadas com as biomoléculas foram caracterizadas em todas as fases em relação ao raio hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão em equipamento Zetasizer, por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz.

Termos para indexação: nanoestruturas, biossensores, cobre, automontagem.

Synthesis and stabilization of a gold nanoparticle bound to a peptide and prepared by β -glucan as a reducing agent

Abstract — Peptide-functionalized gold nanoparticles are commonly synthesized due to the ability of peptides to control amino acid sequence variation, physical-chemical stability, synthetic accessibility, and easy manipulation. The peptide chosen for functionalization of the nanoparticles has the following sequence of amino acid residues: H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂, in which the cysteine residue (C) binds the peptide to metallic gold and the histidine residue (H) is the main binding site for Cu²⁺ metal ions. Furthermore, this study aims to promote the biosynthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using β -glucan as a strategy for enhancing their colloidal stability. β -glucans act as reductants and stabilizers that induce the formation of AuNPs on the external surface of β -glucan itself. The gold nanoparticles obtained were characterized in all steps by measuring the hydrodynamic radius, zeta potential and polydispersity index and in Zetasizer equipment, through dynamic light scattering measurements.

Index terms: biosensors, copper, nanostructures, self-assembly.

Introdução

A poluição por metais tóxicos é uma contaminação abrangente sendo difícil eliminá-la devido à sua característica persistente na cadeia alimentar, resultando na transmissão e enriquecimento de metais pesados, colocando em risco a saúde humana. O avanço da nanotecnologia abre novas oportunidades para a aplicação de nanomateriais em ensaios bioquímicos devido às características estruturais e fotofísicas únicas das nanopartículas. Dentre estas aplicações estão os biossensores para íons metálicos que se valem da

especificidade de ligação das biomoléculas. As nanopartículas de ouro (Turkevich et al., 1951) podem ser funcionalizadas com peptídeo diretamente por meio da ligação de resíduos de cisteína à superfície metálica ou pela modificação do peptídeo com a inserção de um espaçador com grupo sulfidril (Egorova et al., 2020). A ligação de peptídeos a íons metálicos apresenta aspectos de especificidade e seletividade que a torna uma estratégia valiosa de aplicações biotecnológicas, como a construção de biossensores (Lévy et al., 2004). Devido ao tamanho pequeno, da ordem de 5 a 200 nm, as nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com peptídeos possuem uma grande área superficial, mas tendem a aglomerar-se e a perderem as suas propriedades únicas relacionadas ao tamanho, forma e distância interparticular (Daniel; Astruc, 2004). Os biossensores baseados em nanopartículas metálicas foram amplamente desenvolvidos para quantificar moléculas em soluções homogêneas, detectando mudança de cor entre estados de dispersão e de agregação das nanopartículas após a ligação ao analito (Slocik et al., 2008). Assim, sondas baseadas em nanopartículas de ouro podem ser projetadas para detectar íons metálicos colorimetricamente em concentrações baixas. Entretanto, é desejável um método para o desenvolvimento de uma síntese verde que estabilize efetivamente as nanopartículas de ouro, diminuindo a citotoxicidade e o impacto ambiental dos agentes redutores clássicos como o boridreto de sódio. Carboidratos como a β -glucana podem ser utilizados como agentes redutores de Au^+ a $\text{Au}(0)$, pois a cadeia principal da molécula contém grupamentos cetais e hemicetais com capacidade redutora. Portanto, as β -glucanas servem como agentes redutores e estabilizadores que induzem a formação de AuNPs na superfície externa da própria β -glucana (Xuewei, 2013) Este trabalho buscou modificar as soluções de nanopartículas de ouro preparadas com peptídeos e sintetizar as nanoestruturas (AuNPs) utilizando β -glucana; os objetivos foram: 1. Conduzir a síntese de nanopartículas de ouro por via aquosa utilizando-se o boridreto de sódio como agente redutor; 2. Modificar as nanopartículas com um peptídeo com capacidade de ligação a Cu^{2+} por automontagem, que é um método extremamente versátil e de custo relativamente baixo; 3. Fazer ensaios preliminares da utilização da β -glucana como agente redutor verde para a obtenção das nanoestruturas metálicas..

Os resultados desse trabalho vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo no seguinte objetivo específico: ODS 15 - Vida Sobre a Terra: Proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da terra e deter a perda de biodiversidade.

Material e métodos

A preparação das soluções coloidais de nanopartículas de ouro (AuNP), desenvolvida no Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para a Pecuária (LINMAP) da Embrapa Gado de Leite, foi conduzida com base em reações de oxido-redução, utilizando o boridreto de sódio como agente redutor e estabilizante (Deraedt et al., 2014; Xiaomin et al., 2022). Foi dissolvido 1,5 mg de ácido cloroáurico (HAuCl_4) na concentração de $4,4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ em 30 mL de água ultrapura Milli-Q, que foi mantida sob agitação constante por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a agitação por 20 minutos, 1 mL de uma solução de boridreto de sódio (1,5 mg de NaBH_4 , $\text{MM} = 37,83 \text{ g/mol}$, $3,96 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$), foi adicionado rapidamente sobre a solução áurica, obtendo-se uma coloração avermelhada instantaneamente. A solução foi submetida à diálise, utilizando-se uma membrana com diâmetro médio de 34 mm, MWCO 3,5 kDa, durante dois dias. Para a ligação ao Cu^{2+} a membrana contendo as AuNPs ficou submersa em uma solução de

cloreto de cobre ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L; 160 mg) realizando-se a troca de água por três a quatro vezes. Este mesmo procedimento foi repetido com a substituição do CuCl_2 pelo MgCl_2 ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) para verificar se ocorreria uma ligação seletiva do Cu^{2+} . Posteriormente, o pH da solução coloidal foi variado utilizando-se uma solução de NaOH (1,0 mol/L), ajustando-se o pH de 4 para 10, quando foi possível observar a mudança da cor avermelhada para um azul escuro. Em seguida, foi preparado 1 mL de uma solução aquosa do peptídeo a $1,25 \times 10^{-3}$ mol/L (H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂, MM= 1547,0 g/mol, 20 mg) e aplicou-se uma alíquota de 20 μL na suspensão de AuNP que ficou em agitação por dez minutos. Para a utilização da β -glucana como agente redutor, 0,1 g do polissacarídeo foi adicionado em 30 mL de água Milli-Q e a solução foi mantida sob agitação constante durante 24 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada por dez minutos e retirou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressolubilizado em 30 mL de água Milli-Q e teve seu pH ajustado para 10. Subsequentemente, a solução foi aquecida até ebulição e foram adicionados 500 μL de solução de ácido cloroáurico. Observou-se a mudança de coloração da solução durante 10-15 minutos.

Resultados e discussão

O índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e o tamanho das nanoestruturas de ouro (raio hidrodinâmico) foram obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS) a 25 °C. Como mostrado na Tabela 1, ocorreu aumento progressivo do raio hidrodinâmico das AuNPs funcionalizadas com peptídeo e em solução de cloreto de cobre quando comparadas com as AuNPs obtidas originalmente com NaBH_4 . Este efeito é justificado pelo acoplamento do peptídeo, que possui carga líquida positiva mesmo em pH 10. As nanopartículas sintetizadas com boridreto de sódio possuem estabilidade coloidal, pouca ou nenhuma agregação, apresentando valor médio de carga superficial de -36,4 mV. O valor de PZ diminuiu após a interação com o peptídeo devido à presença de cargas no grupo amino na cadeia lateral de lisina (K) e no grupamento histidina (H) da estrutura peptídica (Xiaomin et al., 2022). Para neutralizar parcialmente estas cargas, a ligação do peptídeo foi conduzida em pH 10, o que foi insuficiente para impedir a agregação das nanoestruturas. Os índices de polidispersividade são considerados aceitáveis, mostrando uniformidade na distribuição dos tamanhos, com valores de PDI de 0,2 a 0,4 para todas as nanoestruturas (Casanova, 2010). Apesar da carga negativa da nanoestrutura ter sido menor que -25 mV, o que indicaria a estabilidade coloidal, as AuNPs em solução de CuCl_2 agregaram durante a diálise, perdendo a coloração e apresentando um corpo de fundo. As AuNPs em solução de MgCl_2 mudaram de cor, passando de avermelhado para roxo escuro durante a diálise, apresentando maior estabilidade a despeito da carga superficial reduzida, -10,1 mV. As AuNPs preparadas pela β -glucana adquiriram uma coloração levemente avermelhada, apresentando estabilidade e uniformidade na distribuição dos tamanhos. Entretanto, a dimensão está fora da escala nanométrica.

Tabela 1. Índice de polidispersão (PDI), raio hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de ouro. Um valor representativo de medição é mostrado juntamente com o seu PDI.

Nanopartículas	PDI	Potencial zeta(mV)	Raio hidrodinâmico
AuNP com NaBH_4	0,271	-36,4	55,0
AuNP com peptídeo	0,238	-14,1	159,8
AuNP em Cu^{2+}	0,398	-15,5	95,4
AuNP em Mg^{2+}	0,402	-10,1	116,4
AuNP com β -glucana	0,392	-11,5	3610

Conclusões

Concluiu-se que foi possível a síntese das nanoestruturas de ouro preparadas com peptídeos por meio de técnicas simples, controlando o tamanho e forma. A estabilidade da dispersão coloidal depende de outras técnicas que favoreçam a detecção do analito íon Cu^{2+} . Mais análises precisam ser conduzidas para otimizar a solubilidade da β -glucana, a fim de alcançar melhores resultados.

Agradecimentos

Ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig). À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da bolsa recebida do Programa Pibic, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado e ao pesquisador Marcelo Porto Bemquerer pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e treinamento.

Referências

- CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293-346, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr030698+>.
- DERAEDT, C.; SALMON, L.; GATARD, S.; CIGANDA, R.; HERNANDEZ, R.; RUIZ, J.; ASTRUC, D. Sodium borohydride stabilizes very active gold nanoparticle catalysts. **Chemical Communications**, v. 50, n. 91, p. 14194-14196, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c4cc05946h>.
- EGOROVA, E. A.; VAN RIJT, M. M. J.; SOMMERDIJK, N.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A.; BOYLE, A. L.; KROS, A. One peptide for them all: gold nanoparticles of different sizes are stabilized by a common peptide amphiphile. **ACS Nano**, v. 14, n. 5, p. 5874-5886, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c01021>.
- LÉVY, R.; THANH, N. T. K.; DOTY, R. C.; HUSSAIN, I.; NICHOLS, R. J.; SCHIFFRIN, D. J.; BRUST, M.; FERNIG, D. G. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 32, p. 10076-10084, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0487269>.
- SLOCIK, J. M.; ZABINSKI JR., J. S.; PHILLIPS, D. M.; NAIK, R. R. Colorimetric response of peptide-functionalized gold nanoparticles to metal ions. **Small**, v. 4, n. 5, p. 548-551, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/smll.200700920>.
- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.
- XIAOMIN, X.; YANG, L.; YUJIE, Y.; WU, J.M.; CAO, M.; LI, S. One-pot synthesis of functional peptide-modified gold nanoparticles for gene delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 640, 128491, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128491>.
- XUEWEI, J.; XIAOJUAN, X.; ZHANG, L. Synthesis and stabilization of gold nanoparticles induced by denaturation and renaturation of triple helical β -glucan in water. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 6, p.1787-1794, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm400182q>.