

INÊS ISABEL FERNANDES GOMES

**INTERACÇÃO DE PROTEÍNAS COM SUPERFÍCIES
NANOESTRUTURADAS E NANOPARTÍCULAS DE
METAIS NOBRES**

LISBOA

2009

- nº de arquivo

- “copyright”

INÊS ISABEL FERNANDES GOMES

**INTERACÇÃO DE PROTEÍNAS COM SUPERFÍCIES
NANOESTRUTURADAS E NANOPARTÍCULAS DE METAIS
NOBRES**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
Doutor em Química Inorgânica pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.

LISBOA

2009

Com muito carinho,

À minha avó

À minha mãe

Ao meu marido

AGRADECIMENTOS

A tese de doutoramento apresentada é fruto de um projecto com início em 2005, que envolveu ao longo destes 4 anos muito trabalho, esforço, dedicação e o gratificante contributo de todos os que acarinharam este projecto.

Um agradecimento muito especial ao meu orientador, Professor Ricardo Franco. Expresso a minha sincera amizade e profunda gratidão por ter acreditado nas minhas capacidades, pela competente orientação científica, transmissão de conhecimentos científicos, empenho, constante disponibilidade e acompanhamento de todo o trabalho.

Ao Doutor Roberto Di Paolo com quem trabalhei no início deste projecto, estou muito grata pelo apoio, ensinamentos, disponibilidade, acompanhamento e discussão de resultados de Espectroscopia de Raman.

À Doutora Patrícia Pereira pela purificação dos citocromos c_3 . À Professora Soledad Penadés e Doutor Jesús de la Fuente a hospitalidade no Instituto de Investigaciones Químicas, em Sevilha. Particularmente ao Doutor David Alcántara com quem directamente trabalhei na síntese do neoglioconjugado de maltose, estou muito agradecida pelo acolhimento, inter-ajuda, partilha de conhecimentos e atenção.

À Doutora Ana Viana, agradeço imenso as medidas de Microscopia de Força Atómica, o bom acolhimento no laboratório de SPM, a simpatia, atenção, interesse pelo trabalho e discussão de resultados.

Ao Professor Nuno Santos estou extremamente grata pelo constante empenho e disponibilidade, partilha de conhecimentos e discussão de resultados, inter-ajuda, amabilidade e bom acolhimento na Unidade de Biomembranas. Ao Marco um abraço de agradecimento pela disponibilidade, apoio e acompanhamento inicial das medidas de Dispersão de Luz, um grande beijinho para a Sónia, Filomena, Teresa, Ana e Pedro. Obrigada pelo carinho!

Ao Professor Alexandre Quintas e ao Luís Oliveira, estou grata pela simpatia com que me receberam no laboratório de Patologia Molecular, acompanhamento das medidas de Dicroísmo Circular, tratamento e discussão de resultados.

À Professora Eulália Pereira agradeço a amabilidade e a colaboração científica na discussão de resultados.

Ao Doutor Peter Eaton as medidas de AFM das nanopartículas de ouro e dos bionanoconjugados.

À Dra. Carla Rodrigues as análises de Espectroscopia de Emissão Atómica por Plasma Acoplado Indutivamente.

Ao Pedro Quaresma um muito obrigada pelas medidas de Microscopia Electrónica de Transmissão e síntese das nanopartículas de ouro funcionalizadas, pela troca de ideias, boa disposição, apoio e disponibilidade. Ao Gonçalo Doria agradeço a partilha de conhecimentos, atenção, disponibilidade e apoio.

Aos colegas e amigos um sincero agradecimento pelo apoio e carinho, especialmente à Ana Rita, Celina, Maitê e António.

À minha avó, à minha mãe e ao meu marido muito obrigada pelo vosso amor.

Estou muito reconhecida ao *REQUIMTE, Departamento de Química da FCT-UNL*, onde a maior parte deste trabalho foi desenvolvido e ao *Instituto de Tecnologia Química e Biológica da UNL*, onde iniciei o meu trabalho de doutoramento.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pela bolsa de doutoramento que me foi concedida (SFRH/BD/18630/2004), co-financiada pelo Programa Operacional Ciência e Inovação 2010 e Fundo Social Europeu.



Programa Operacional Ciência e Inovação 2010
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

UNIÃO EUROPEIA

Fundo Social Europeu



RESUMO

Na interface entre a Bioquímica e a Nanotecnologia surge a Bionanotecnologia, área científica relacionada com o estudo das aplicações de biomoléculas em dispositivos de base nanotecnológica, como por exemplo em biossensores para aplicação em diagnóstico clínico. Neste contexto, as interações de proteínas com superfícies nanoestruturadas e nanopartículas de metais nobres, que constituem o objecto de estudo da presente tese, são especialmente importantes. De facto, do estudo da estrutura e função de proteínas em associação com tais nanoestruturas metálicas podem surgir pistas para a concepção racional de bio-nanosensores.

A primeira parte deste trabalho consistiu no estudo espectroelectroquímico de citocromos c_3 do Tipo II e do Tipo I, adsorvidos a monocamadas auto-montadas (SAM) de ácido mercaptoundecanóico ou de neoglicoconjugado de maltose à superfície de eléctrodos de prata, pela aplicação de Espectroscopia de Ressonância de Raman. A SAM de neoglicoconjugado de maltose permitiu a determinação dos potenciais de redução dos quatro hemos para as proteínas estudadas e demonstrou um melhor desempenho espectroelectroquímico comparativamente com a SAM de ácido mercaptoundecanóico para ambos os citocromos c_3 .

Foi também estudada por Microscopia de Força Atómica (AFM), a imobilização da ferroquelatase recombinante de fígado de rato em SAM de alcanotióis com grupos terminais com diferentes funcionalidades, à superfície de ouro. O modo de adsorção da ferroquelatase à superfície de ouro foi dependente do tipo de SAM, ajudando a definir superfícies promissoras para o desenvolvimento de biossensores com elevada especificidade.

Na segunda parte deste trabalho estudou-se a formação de bionanoconjugados constituídos por citocromo c de coração de cavalo (HCc) ou citocromo c de levedura (YCc) com nanopartículas de ouro (AuNP) revestidas com citrato de sódio. A formação dos bionanoconjugados foi comprovada pelo desvio para o vermelho da banda de ressonância plasmónica superficial (SPR), aumento do valor de potencial zeta e detecção de aumento de tamanho por AFM.

Os bionanoconjugados formados apresentaram diferentes propriedades de superfície, que foram relacionadas com diferentes modos de ligação das proteínas às AuNP:

através de uma ligação covalente pelo resíduo de cisteína 102 para YCc e através de interações electrostáticas para HCc.

Na perspectiva de melhorar a capacidade de adsorção da proteína à superfície das nanopartículas formaram-se bionanoconjugados com HCc e AuNP funcionalizadas com ácido mercaptoundecanóico (MUA). O modo de ligação electrostática parece ser mais eficaz entre os MUA e a proteína, relativamente à superfície de citrato, demonstrando que a funcionalização é uma estratégia eficaz para a obtenção de bionanoconjugados mais estáveis e robustos.

Estudou-se ainda as alterações conformacionais das proteínas nos bionanoconjugados por Espectroscopia de UV-visível, que revelou padrões de protonação de superfície através dos diferentes valores para o pH de agregação; e Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) que demonstrou que o pH do meio determina a conformação da proteína no bionanoconjugado.

A investigação das interações entre proteínas e nanopartículas metálicas permite racionalizar a formação de bionanoconjugados com novas propriedades de superfície e potenciais aplicações em bioensaios e biossensores.

Palavras-chave: proteínas, superfícies nanoestruturadas, monocamadas auto-montadas, nanopartículas de ouro, citocromos do tipo *c*, Bionanotecnologia.

ABSTRACT

In the interface between Biochemistry and Nanotechnology emerges Bionanotechnology, a scientific area concerned with the study of the applications of biomolecules in nanotechnological based devices, such as in biosensors for medical diagnostics. In this context, the interactions of proteins with noble metal nanostructured surfaces and nanoparticles, are specially important and are the theme of the present thesis. In fact, the study of the structure and function of proteins in association with such metallic nanostructures can direct the rational design of bio-nanosensors.

The first part of this work consists of a spectroelectrochemistry study of Type II and Type I cytochromes c_3 , adsorbed on a self-assembled monolayer (SAM) of mercapto-undecanoic acid or maltose neoglycoconjugate at the surface of silver electrodes, by Resonance Raman Spectroscopy. The maltose neoglycoconjugate SAM allowed the determination of the four hemes' redox potentials for both proteins and demonstrated enhanced spectroelectrochemical performance for both cytochromes c_3 , in comparison with the mercapto-undecanoic acid SAM.

The immobilization of recombinant mouse liver ferrochelatase on SAMs of alkanethiols was studied by Atomic Force Microscopy (AFM). The SAMs presented terminals groups with different functionalities and were attached to a gold surface. The adsorption mode of the ferrochelatase to the gold surface depended on the type of SAM, helping to define promising surfaces for the development of biosensors with high specificity.

In the second part of this work the formation of bionanoconjugates created by cytochrome *c* from horse heart (HCc) or yeast (YCc) and sodium citrate-stabilized gold nanoparticles (AuNP) was studied. The formation of the bionanoconjugates was proven by red-shift of the surface plasmon resonance band (SPR), increase of the zeta potential and size increase detected by AFM.

Both bionanoconjugates formed presented different surface properties that can be related with the distinct binding mode of the proteins to the AuNP: via a covalent bond formed by cystein 102 residue for YCc and via electrostatic interaction for HCc.

With the aim of improving the capacity of adsorption of the protein to the AuNP surface, bionanoconjugates were formed by conjugating HCc and mercapto-undecanoic acid (MUA) functionalized gold nanoparticles. The electrostatic binding seems to be more

efficient between the MUA and the protein, relatively to the citrate surface, demonstrating that functionalization is an effective strategy for obtaining more stable and robust bionanoconjugates.

Protein conformational changes in the bionanoconjugates were also studied by UV-visible Spectroscopy. These studies revealed distinct patterns of surface protonation as evaluated by the different pH of the aggregation. Circular Dichroism (CD) Spectroscopy demonstrated that the pH of the environment determines protein conformation in the bionanoconjugate.

The investigation of the interactions between proteins and metallic nanoparticles establishes the bases for the formation of bionanoconjugates with novel surface properties and potential applications in bioassays and biosensors.

Keywords: proteins, nanostructured surfaces, self-assembled monolayers, gold nanoparticles, type c cytochromes, Bionanotechnology.

ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
AuNP	Nanopartículas de ouro revestidas com citrato de sódio
BSA	Albumina de soro de bovino
C ₁₁ -ácido	Ácido 11-mercaptoundecanóico
C ₁₁ -maltose	11-mercapto-undecanil- β -maltósido
CD	Dicroísmo Circular
ChT	Alfa-quimiotripsina
Cyt <i>c</i>	Citocromo <i>c</i>
<i>d</i> (H)	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica
DSP	Propionato de ditio-bis succinimidil
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ENH	Eléctrodo Normal de Hidrogénio
HCC	Citocromo <i>c</i> de coração de cavalo
HCC-AuNP	Bionanoconjugado de citocromo <i>c</i> de coração de cavalo-nanopartículas de ouro
HCC-MUA-AuNP	Bionanoconjugado de citocromo <i>c</i> de coração de cavalo-nanopartículas de ouro funcionalizadas com ácido 11-mercaptoundecanóico
ICP	Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente
MUA	Ácido 11-Mercaptoundecanóico
MUA-AuNP	Nanopartículas de ouro funcionalizadas com ácido 11-mercaptoundecanóico
NHS	N-hidroxisuccinimida
pI	Ponto Isoelétrico
RR	Ressonância de Raman
SAM	Monocamada Auto-Montada
SERRS	Espectroscopia de Ressonância de Raman Aumentada pela Superfície
SPM	Microscopia de Varrimento de Sonda
SPR	Ressonância Plasmónica Superficial

TEM	Microscopia Electrónica de Transmissão
TpI- c_3	Citocromo c_3 do Tipo I
TpII- c_3	Citocromo c_3 do Tipo II
YCc	Citocromo c de levedura
YCc-AuNP	Bionanoconjugado de citocromo c de levedura-nanopartículas de ouro
ζ -potencial	Potencial Zeta

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Abreviaturas	ix
Índice Geral	xi
Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas	xxv

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Introdução	3
1.1.1 Interacção de proteínas com superfícies nanoestruturadas	4
1.1.2 Interacção de proteínas com nanopartículas de ouro	6
1.1.3 Citocromos do tipo <i>c</i>	7
1.1.4 Tipos de interacção entre proteínas e superfícies metálicas.....	9
1.1.5 Efeitos na conformação da proteína	9
1.2 Técnicas para a Caracterização da Interacção de Proteínas com Superfícies Nanoestruturadas e Nanopartículas de Metais Nobres.....	10
1.2.1 Medidas de Espectroscopia.....	10
1.2.1.1 Espectroscopia de Ressonância de Raman (RR) e Espectroscopia de Ressonância de Raman Aumentada pela Superfície (SERRS).....	10
1.2.1.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	12
1.2.2 Medidas de Microscopia	14
1.2.2.1 Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM).....	14
1.2.2.2 Microscopia de Força Atómica (AFM)	14
1.2.3 Medidas de Dispersão de Luz.....	15
1.2.3.1 Medidas de Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)	15
1.2.3.2 Medidas de Potencial Zeta (ζ -potencial)	16
1.3 Bibliografia	18

PARTE I. Interação de Proteínas com Superfícies Nanoestruturadas de Prata e Ouro

CAPÍTULO 2. ESTUDO POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA DE RAMAN DA TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA EM CITOCROMOS C_3 ADSORVIDOS A ELÉCTRODOS DE PRATA

2.1	Introdução	25
2.2	Procedimento Experimental	28
2.2.1	Preparação dos citocromos c_3	28
2.2.2	Monocamadas auto-montadas de ácido mercaptoundecanóico ou neoglicoconjugado de maltose	28
2.2.3	Medidas de Espectroscopia de Raman	28
2.2.4	Tratamento de Resultados	30
2.3	Resultados	30
2.3.1	Medidas de Espectroscopia de Ressonância de Raman (RR)	30
2.3.2	Medidas de Espectroscopia de Ressonância de Raman Aumentada pela Superfície (SERRS)	32
2.3.3	Análise de desconvolução dos espectros de RR e SERRS.....	34
2.3.4	Determinação dos potenciais de redução.....	36
2.4	Discussão de Resultados	42
2.5	Conclusões	44
2.6	Bibliografia	45

CAPÍTULO 3. IMOBILIZAÇÃO DA FERROQUELATASE EM MONOCAMADAS AUTO-MONTADAS À SUPERFÍCIE DE OURO

3.1	Introdução	49
3.2	Procedimento Experimental	53
3.2.1	Preparação da ferroquelatase.....	53
3.2.2	Preparação dos substratos de ouro para imobilização da ferroquelatase	53
3.2.3	Medidas de Microscopia de Força Atómica (AFM)	55

3.3	Resultados	55
3.3.1	Caracterização dos substratos de ouro por AFM	55
3.3.2	Caracterização da ferroquelatase imobilizada em monocamadas auto-montadas à superfície de ouro por AFM	56
3.3.2.1	Caracterização da ferroquelatase imobilizada em monocamadas auto-montadas puras à superfície de ouro	57
3.3.2.2	Caracterização da ferroquelatase imobilizada em monocamadas auto-montadas mistas à superfície de ouro	59
3.3.2.3	Caracterização da ferroquelatase imobilizada covalentemente em monocamadas auto-montadas à superfície de ouro	61
3.4	Discussão de Resultados	63
3.5	Conclusões	67
3.6	Bibliografia	68

PARTE II. Interacção de Proteínas com Nanopartículas de Ouro

CAPÍTULO 4. FORMAÇÃO DE BIONANOCONJUGADOS CITOCROMO C - NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.1	Introdução	73
4.2	Procedimento Experimental	75
4.2.1	Preparação dos bionanoconjugados	75
4.2.2	Medidas de Espectroscopia e Microscopia	75
4.2.2.1	Espectroscopia de UV-visível.....	75
4.2.2.2	Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	76
4.2.2.3	Microscopia de Força Atómica (AFM)	76
4.2.2.4	Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM).....	77
4.2.3	Medidas de Dispersão de Luz.....	77
4.2.3.1	Medidas de Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)	78
4.2.3.2	Medidas de Potencial Zeta (ζ -potencial)	78
4.3	Resultados	79

4.3.1	Caracterização das nanopartículas de ouro	79
4.3.2	Avaliação da superfície de revestimento dos bionanoconjugados	80
4.3.2.1	Medidas de Dispersão de Luz Dinâmica	81
4.3.2.2	Medidas de Potencial Zeta	83
4.3.3	Caracterização dos bionanoconjugados por Espectroscopia de UV-visível	87
4.3.4	Caracterização dos bionanoconjugados por Microscopia de Força Atómica	88
4.3.5	Caracterização dos bionanoconjugados por Microscopia Electrónica de Transmissão....	89
4.3.6	Alterações estruturais da proteína nos bionanoconjugados por Espectroscopia de Dicroísmo Circular	91
4.4	Discussão de Resultados	93
4.5	Conclusões	96
4.6	Bibliografia	97

CAPÍTULO 5. FORMAÇÃO DE BIONANOCONJUGADOS CITOCROMO C - NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS

5.1	Introdução	103
5.2	Procedimento Experimental	104
5.2.1	Preparação das nanopartículas de ouro funcionalizadas e dos bionanoconjugados	104
5.2.2	Medidas de Espectroscopia e Microscopia	105
5.2.3	Medidas de Dispersão de Luz.....	106
5.3	Resultados	106
5.3.1	Caracterização das nanopartículas de ouro funcionalizadas	106
5.3.2	Avaliação da superfície de revestimento dos bionanoconjugados.....	108
5.3.3	Caracterização do bionanoconjugado por Espectroscopia de UV-visível	110
5.3.4	Caracterização do bionanoconjugado por Microscopia de Força Atómica	111
5.4	Discussão de Resultados	111
5.5	Conclusões	114
5.6	Bibliografia	115

CAPÍTULO 6. ESTUDO DO EFEITO DO pH NOS BIONANOCONJUGADOS - PERSPECTIVA DE UTILIZAÇÃO COMO BIOSENSOR

6.1	Introdução	119
6.2	Procedimento Experimental	120
6.2.1	Preparação dos bionanoconjugados	120
6.2.2	Medidas de Espectroscopia.....	120
6.2.2.1	Ajuste de pH nos bionanoconjugados para Espectroscopia de UV-visível	120
6.2.2.2	Ajuste de pH nos bionanoconjugados para Espectroscopia de Dicroísmo Circular	121
6.2.3	Medidas de Dispersão de Luz.....	122
6.2.3.1	Ajuste de pH nos bionanoconjugados para Medidas de Potencial Zeta	122
6.3	Resultados	123
6.3.1	Estudo do efeito do pH nas soluções de AuNP e MUA-AuNP	123
6.3.1.1	Efeito do pH determinado por Espectroscopia de UV-visível	123
6.3.1.2	Efeito do pH determinado por Medidas de Potencial Zeta.....	126
6.3.2	Estudo do efeito do pH nos bionanoconjugados Cyt c - AuNP	127
6.3.2.1	Efeito do pH nos bionanoconjugados determinado por Espectroscopia de UV-visível....	127
6.3.2.2	Efeito do pH nos bionanoconjugados determinado por Espectroscopia de Dicroísmo Circular	131
6.3.3	Estudo do efeito do pH nos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP	136
6.3.3.1	Efeito do pH nos bionanoconjugados determinado por Espectroscopia de UV-visível....	136
6.3.3.2	Efeito do pH nos bionanoconjugados determinado por Medidas de Potencial Zeta .	137
6.4	Discussão de Resultados	139
6.5	Conclusões	143
6.6	Bibliografia	143

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

7.1	Conclusões Globais.....	147
7.2	Perspectivas Futuras.....	149

APÊNDICES

Apêndice I Síntese e purificação do neoglicoconjugado de maltose	153
Apêndice II Preparação dos eléctrodos de prata	155
Apêndice III Isolamento e purificação da ferroquelatase recombinante de fígado de rato	156
Apêndice III.1 Meios de cultura para o crescimento de bactérias <i>E. coli</i> que contêm o plasmídeo pGF42	158
III.1.1 Composição do meio LB sólido	158
III.1.2 Composição do meio LB líquido	158
III.1.3 Composição do meio com fosfato limitante	159
III.1.4 Composição das soluções para o meio com fosfato limitante.....	160
Apêndice III.2 Determinação da massa molecular e grau de pureza da proteína por electroforese em gel de SDS-PAGE.....	161
Apêndice IV Síntese de nanopartículas de ouro.....	164
Apêndice V Preparação das soluções de citocromo <i>c</i>.....	165
Apêndice VI Determinação do número teórico de moléculas de citocromo <i>c</i> adsorvidas à superfície da AuNP e adsorvidas à superfície da MUA-AuNP.....	166
Apêndice VII Preparação de amostras para análise por Espectroscopia de Emissão Atómica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP).....	169
Bibliografia	170

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 Representação esquemática da estrutura de uma monocamada auto-montada (SAM).....	5
Figura 1.2 Estrutura do citocromo <i>c</i> com evidência do grupo hemo. Código de acesso PBD: 1 HRC.....	7
Figura 1.3 Transições electrónicas observadas nas espectroscopias de infravermelho (IR) e de Raman (adaptado da referência [30]).	11
Figura 1.4 Espectros de CD característicos de diferentes conformações da cadeia polipeptídica (a) hélice α ; (b) folha β ; (c) volta β (“ β turn”) e (d) espiral aleatória (“random coil”) (adaptado da referência [33]).	13
Figura 1.5 Representação esquemática do potencial zeta (adaptado da referência [42]).	17

PARTE I. CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Representação esquemática do citocromo <i>c</i> ₃ adsorvido na SAM de C ₁₁ -ácido que reveste o eléctrodo de prata.	26
Figura 2.2 (a) Estrutura química do neoglicoconjugado de maltose e (b) Representação esquemática do citocromo <i>c</i> ₃ adsorvido na SAM de C ₁₁ -maltose que reveste o eléctrodo de prata.....	27
Figura 2.3 Espectros de RR do TplI- <i>c</i> ₃ em solução (a) no estado oxidado e (b) no estado reduzido.	31
Figura 2.4 (a) Espectros de SERRS do TplI- <i>c</i> ₃ adsorvido na SAM de C ₁₁ -maltose que reveste o eléctrodo de prata a potenciais aplicados de 0,0 V a -0,5 V (b) Espectros de SERRS do TplI- <i>c</i> ₃ adsorvido na SAM de C ₁₁ -ácido que reveste o eléctrodo de prata aos potenciais aplicados de 0,0 V a -0,5 V. (Ambos os conjuntos de espectros foram obtidos nas mesmas condições experimentais de modo a permitir comparações).....	33
Figura 2.5 Espectro de SERRS (linhas ν_4) do TplI- <i>c</i> ₃ adsorvido na SAM de C ₁₁ -maltose que reveste o eléctrodo de prata ao potencial aplicado ao eléctrodo de -0,40 V. Os círculos representam os pontos experimentais e a linha preta contínua resulta da soma do ajuste em linhas Lorentzianas dos componentes individuais do espectro: as linhas cor-de-rosa correspondem às duas espécies oxidadas (1368 e 1375 cm ⁻¹) e a linha azul corresponde à espécie reduzida (1358 cm ⁻¹).	35

Figura 2.6 Concentrações relativas das três espécies envolvidas na análise do espectro de TplI-c ₃ adsorvido na SAM de C ₁₁ -maltose que reveste o eléctrodo de prata, em função de cada potencial aplicado ao eléctrodo: estado oxidado a 1368 cm ⁻¹ [Áreas espécie oxidada / Σ (Áreas das duas espécies oxidadas + Áreas espécie reduzida)], estado oxidado a 1375 cm ⁻¹ e estado reduzido a 1358 cm ⁻¹ [Áreas espécie reduzida / Σ (Áreas das duas espécies oxidadas + Áreas espécie reduzida)].	36
Figura 2.7 Razão da concentração [Reduzido] / [Oxidado] do TplI-c ₃ imobilizado na SAM de C ₁₁ -maltose que reveste o eléctrodo de prata em função do potencial aplicado ao eléctrodo. Os círculos representam os dados experimentais e a linha representa o melhor ajuste obtido a partir da equação de Nernst.	37
Figura 2.8 Potenciais de redução do TplI-c ₃ para os quatro hemos da SAM de C ₁₁ -maltose, SAM de C ₁₁ -ácido e titulação redox por UV-vis do TplI-c ₃ em solução.	39
Figura 2.9 Potenciais de redução do Tpl-c ₃ para os quatro hemos da SAM de C ₁₁ -maltose, SAM de C ₁₁ -ácido e titulação redox por RMN do Tpl-c ₃ em solução.	40
Figura 2.10 (a) Espectros de SERRS (linhas ν_4) do TplI-c ₃ (linha cinzenta) e Tpl-c ₃ (linha preta) adsorvidos na SAM de C ₁₁ -maltose ao potencial aplicado ao eléctrodo de 0,0 V (linhas sólidas) e -0,5 V (linhas tracejadas) e (b) Espectros de SERRS (linhas ν_4) do TplI-c ₃ (linha cinzenta) e Tpl-c ₃ (linha preta) adsorvidos na SAM de C ₁₁ -ácido ao potencial aplicado ao eléctrodo de 0,0 V (linhas sólidas) e -0,5 V (linhas tracejadas).....	41

PARTE I. CAPÍTULO 3

Figura 3.1 Reacção catalisada pela ferroquelatase (adaptado da referência [6]).....	49
Figura 3.2 Representação esquemática da imobilização da ferroquelatase em SAM de COOH activada com EDC/NHS à superfície de ouro.	51
Figura 3.3 Representação esquemática da imobilização da ferroquelatase em SAM de DSP puro à superfície de ouro.	52
Figura 3.4 Imagens topográficas de AFM no modo intermitente (a) superfície de ouro (b) superfície de ouro recoberta com a SAM catiónica HS(CH ₂) ₁₁ NH ₂ .HCl e (c) superfície de ouro recoberta com a ferroquelatase.	56
Figura 3.5 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM pura neutra-hidrofóbica HS(CH ₂) ₅ CH ₃ e (b) Análise de secção da proteína.	57

Figura 3.6 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM pura catiónica $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ e (b) Análise de secção da proteína.....	58
Figura 3.7 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM pura aniónica $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ e (b) Análise de secção da proteína.....	58
Figura 3.8 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM mista 50% $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$: 50% $\text{HS}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ e (b) Análise de secção da proteína.....	60
Figura 3.9 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM mista 80% $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$: 20% $\text{HS}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ e (b) Análise de secção da proteína.....	60
Figura 3.10 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM mista covalente 90% DSP ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$) : 10% $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ e (b) Análise de secção da proteína.	61
Figura 3.11 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ activada com EDC/NHS e (b) Análise de secção da proteína.....	62
Figura 3.12 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM de DSP puro e (b) Análise de secção da proteína.....	63
Figura 3.13 Potenciais electrostáticos de superfície da estrutura 3D de raios-X da ferroquelatase humana (código de acesso PDB: 1HRK), com uma distribuição de cargas uniforme em que não existe qualquer face extensa preferencial para contacto com a SAM, que seria caracterizada por uma concentração de resíduos carregados positiva ou negativamente. As zonas representadas a vermelho correspondem aos potenciais negativos e a azul aos potenciais positivos, num intervalo de potenciais de -5 a 5 KTe^{-1} . As figuras foram preparadas usando o utilitário Swiss-Pdb Viewer 3.7.	66

PARTE II. CAPÍTULO 4

Figura 4.1 Histograma de distribuição de tamanhos da contagem de 1754 AuNP com diâmetro médio de $13,9 \pm 3,3 \text{ nm}$	80
--	----

Figura 4.2 Imagem de TEM da solução de AuNP a pH 11. A barra de escala corresponde a 200 nm.	80
Figura 4.3 (a) Diâmetro hidrodinâmico dos bionanoconjugados HCc-AuNP em função da razão [HCc] / [AuNP] a pH 11 e (b) Diâmetro hidrodinâmico dos bionanoconjugados YCc-AuNP em função da razão [YCc] / [AuNP] a pH 11. Cada barra corresponde a uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio.	82
Figura 4.4 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HCc-AuNP em função da razão [HCc] / [AuNP] a pH 11. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio. A linha preta representa o ajuste a uma isotérmica de adsorção de Langmuir (equação 3).	84
Figura 4.5 Potencial Zeta dos bionanoconjugados YCc-AuNP em função da razão [YCc] / [AuNP] a pH 11. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio. A linha preta representa o ajuste a uma isotérmica de adsorção de Langmuir (equação 3).	85
Figura 4.6 Espectros de absorção de UV-visível da solução de AuNP e de ambos os bionanoconjugados à razão de 250 e a pH 11.	87
Figura 4.7 (a) Imagem de AFM no modo intermitente do bionanoconjugado YCc-AuNP à razão = 250 e a pH 11 e (b) Histograma de comparação entre as alturas da solução de AuNP (barras brancas) e do bionanoconjugado YCc-AuNP (barras pretas).	88
Figura 4.8 Imagem de TEM do bionanoconjugado YCc-AuNP à razão de 250 e a pH 11. A barra de escala corresponde a 200 nm.	89
Figura 4.9 Histograma de distribuição de tamanhos da contagem de 2094 YCc-AuNP com diâmetro médio de $13,6 \pm 2,2$ nm.	90
Figura 4.10 Imagem de TEM do bionanoconjugado HCc-AuNP à razão de 250 e a pH 11. A barra de escala corresponde a 200 nm.	90
Figura 4.11 (a) Espectros de CD no ultravioleta longínquo do HCc em solução e do bionanoconjugado HCc-AuNP à razão de 250 e a pH 10 e (b) Espectros de CD no ultravioleta longínquo do YCc em solução e do bionanoconjugado YCc-AuNP à razão de 250 e a pH 10.	92

Figura 4.12 Potenciais electrostáticos de superfície da estrutura 3D de raios-X dos citocromos HcC (código de acesso PDB: 1HRC) e YcC (código de acesso PDB: 1YCC), exibindo a face que está mais provavelmente em contacto directo com as AuNP e a face oposta, que está mais provavelmente exposta à solução. A seta representa a localização da cisteína 102. As zonas representadas a vermelho correspondem aos potenciais negativos e a azul aos potenciais positivos, num intervalo de potenciais de -2 a 12 KTe⁻¹. As figuras foram preparadas usando o utilitário Swiss-Pdb Viewer 3.7. 96

PARTE II. CAPÍTULO 5

Figura 5.1 Representação esquemática do bionanoconjugado HcC-MUA-AuNP. 104

Figura 5.2 Espectros de absorção de UV-visível da solução de AuNP e de MUA-AuNP a pH 11. 106

Figura 5.3 Imagem de AFM no modo intermitente de AuNP funcionalizadas com MUA. 107

Figura 5.4 Imagem de AFM no modo intermitente de AuNP não funcionalizadas. 108

Figura 5.5 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HcC-MUA-AuNP em função da razão [HcC] / [MUA-AuNP] a pH 11. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio. A linha preta representa o ajuste a uma isotérmica de adsorção de Langmuir..... 109

Figura 5.6 Espectros de absorção de UV-visível da solução de MUA-AuNP e do bionanoconjugado HcC-MUA-AuNP à razão de 150 e a pH 11..... 111

Figura 5.7 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HcC-MUA-AuNP e HcC-AuNP, em função da razão [HcC] / [MUA-AuNP] e [HcC] / [AuNP] a pH 11. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio. 112

PARTE II. CAPÍTULO 6

Figura 6.1 Espectros de absorção de UV-visível das soluções de AuNP em função do pH. 123

Figura 6.2 Espectros de absorção de UV-visível das soluções de MUA-AuNP em função do pH. 124

Figura 6.3 Variação da razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada em função do pH. As razões para as soluções de AuNP e MUA-AuNP são ($A_{678\text{ nm}} / A_{520\text{ nm}}$) e ($A_{630\text{ nm}} / A_{523\text{ nm}}$), respectivamente. 125

Figura 6.4 Potencial Zeta das soluções de AuNP e MUA-AuNP em função do pH. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio.	126
Figura 6.5 (a) Espectros de absorção de UV-visível dos bionanoconjugados HCc-AuNP à razão de 250, em função do pH e (b) Efeito visual do pH nos bionanoconjugados HCc-AuNP. O valor de pH dos vasos reacionais é 11,0; 10,1; 9,2; 8,2; 7,3; 6,2; 5,0 e 4,0. As fotografias foram tiradas imediatamente após a realização do espectro de absorção a cada valor de pH.	127
Figura 6.6 (a) Espectros de absorção de UV-visível dos bionanoconjugados YCc-AuNP à razão de 250, em função do pH e (b) Efeito visual do pH nos bionanoconjugados YCc-AuNP. O valor de pH dos vasos reacionais é 11,0; 10,1; 9,2; 8,2; 7,3; 6,2; 5,0 e 4,0. As fotografias foram tiradas imediatamente após a realização do espectro de absorção a cada valor de pH.	128
Figura 6.7 Variação da razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada em função do pH. As razões para os bionanoconjugados HCc-AuNP e YCc-AuNP são $(A_{579\text{ nm}} / A_{525\text{ nm}})$ e $(A_{570\text{ nm}} / A_{525\text{ nm}})$, respectivamente.	129
Figura 6.8 Comprimento de onda máximo da banda de Soret em função do pH, para os bionanoconjugados HCc-AuNP e para a solução de HCc.....	130
Figura 6.9 Comprimento de onda máximo da banda de Soret em função do pH, para os bionanoconjugados YCc-AuNP e para a solução de YCc.	131
Figura 6.10 (a) Espectros de CD no ultravioleta longínquo do HCc em solução a pH 10, 7 e 4 e (b) Espectros de CD no ultravioleta longínquo dos bionanoconjugados HCc-AuNP a pH 10, 7 e 4.	132
Figura 6.11 (a) Espectros de CD no ultravioleta longínquo do YCc em solução a pH 10, 7 e 4 e (b) Espectros de CD no ultravioleta longínquo dos bionanoconjugados YCc-AuNP a pH 10, 7 e 4.	134
Figura 6.12 Percentagem de hélice α e folha β do YCc nos bionanoconjugados a pH 10, 7 e 4.	135
Figura 6.13 (a) Espectros de absorção de UV-visível dos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP à razão de 150, em função do pH e (b) Efeito visual do pH nos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP. O valor de pH dos vasos reacionais é 11,0; 10,1; 9,2; 8,2; 7,3; 6,2; 5,0 e 4,0. As fotografias foram tiradas imediatamente após a realização do espectro de absorção a cada valor de pH.	136
Figura 6.14 Variação da razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada $(A_{593\text{ nm}} / A_{525\text{ nm}})$ em função do pH, para os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP. ...	137

Figura 6.15 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP à razão de 150, da solução de MUA-AuNP e de HCC, em função do pH. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio.	138
Figura 6.16 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP e HCC-AuNP à razão de 150, em função do pH. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio.	139
Figura 6.17 Variação da razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada em função do pH. As razões para os bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP e HCC-AuNP são ($A_{593\text{ nm}} / A_{525\text{ nm}}$) e ($A_{580\text{ nm}} / A_{525\text{ nm}}$), respectivamente.	142

APÊNDICES

Figura A.1 Representação esquemática da síntese do neoglicoconjugado de maltose.....	153
Figura A.2 Gel de SDS-PAGE que ilustra a purificação da ferroquelatase.	161
Figura A.3 $\log_{10}$ da massa molecular das proteínas em função das respectivas mobilidades relativas (R_f).	163
Figura A.4 Representação esquemática de uma estrutura cúbica de face centrada (cfc).....	166

ÍNDICE DE TABELAS

PARTE I. CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Parâmetros espectrais de RR do TplI-c ₃ e Tpl-c ₃ nos estados totalmente oxidado e totalmente reduzido.	31
Tabela 2.2 Parâmetros espectrais do TplI-c ₃ e Tpl-c ₃ oxidado e reduzido, imobilizado na SAM de maltose e na SAM de ácido que reveste o eléctrodo de prata e em solução, após desconvolução dos espectros em bandas Lorentzianas.....	35
Tabela 2.3 Potenciais de redução em volt (referem-se ao eléctrodo normal de hidrogénio, ENH) do TplI-c ₃ adsorvido às SAM que revestem os eléctrodos de prata e em solução.	38
Tabela 2.4 Potenciais de redução em volt (referem-se ao eléctrodo normal de hidrogénio, ENH) do Tpl-c ₃ adsorvido às SAM que revestem os eléctrodos de prata e em solução.....	38
Tabela 2.5 Intensidade relativa máxima da espécie oxidada e reduzida e respectiva razão, para o TplI-c ₃ e Tpl-c ₃ adsorvidos na SAM de C ₁₁ -maltose e na SAM de C ₁₁ -ácido.	42

PARTE I. CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 Monocamadas auto-montadas de alcanotióis formadas à superfície de ouro.	54
Tabela 3.2 Medidas de distância horizontal e vertical da ferroquelatase em cada uma das SAM analisadas por AFM.	64

PARTE II. CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 Parâmetros de ajuste da isotérmica de adsorção de Langmuir a partir da equação 3, para ambos os bionanoconjugados.....	86
--	----

PARTE II. CAPÍTULO 5

Tabela 5.1 Parâmetros de ajuste da isotérmica de adsorção de Langmuir para os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP.....	110
Tabela 5.2 Parâmetros de ajuste da isotérmica de adsorção de Langmuir para os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP e HCc-AuNP.	113

PARTE II. CAPÍTULO 6

Tabela 6.1 Conteúdo em hélice α , folha β e espiral aleatória (“random coil”) do HCc em solução e nos bionanoconjugados. 133

Tabela 6.2 Conteúdo em hélice α , folha β e espiral aleatória (“random coil”) do YCc em solução e nos bionanoconjugados. 133

APÊNDICES

Tabela A.1 Composição das soluções para o gel de SDS-PAGE a 12%. 162

Tabela A.2 Padrões de baixo peso molecular e respectivas massas moleculares para electroforese em gel de SDS-PAGE. 163

Tabela A.3 Cálculos para determinação do número de moléculas de HCc ligados à superfície da AuNP. 167

Tabela A.4 Cálculos para determinação do número de moléculas de YCc ligados à superfície da AuNP. 167

Tabela A.5 Cálculos para determinação do número de moléculas de HCc ligados à superfície da MUA-AuNP. 168

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Introdução

A Nano-Ciência aplicada à concepção, desenvolvimento, caracterização, produção e aplicação de novas estruturas à escala atómica e molecular (de 1 a 100 nm) designa-se por Nanotecnologia. Envolve materiais e sistemas manipulados à nano-escala com o objectivo de se formarem novos nanomateriais com características funcionais diferentes do material à macroescala. Os nanomateriais como sejam nanopartículas metálicas, são de extrema importância no campo da Nanotecnologia devido às suas propriedades físicas e químicas, com vantagem na interacção com biomoléculas que faz prever inúmeras aplicações a nível biotecnológico [1].

O avanço da Nanotecnologia é particularmente relevante na medicina, ao nível do diagnóstico rápido e simples de doenças, como sejam a detecção de micobactérias responsáveis pela tuberculose [2], reparação de tecidos e melhoria na biocompatibilidade de implantes [3]. Na indústria têxtil existem várias aplicações de nanotecnologia em nanotêxteis à prova de água e de manchas, o uso de têxteis para o desenvolvimento de uniformes militares [4] e tecidos com propriedades anti-bacterianas [5]. Na indústria alimentar salienta-se o uso de lipossomas para protecção de alimentos contra contaminações microbianas, elaboração de alimentos com novos sabores, nutrientes e texturas [6]. Encontram-se ainda aplicações relevantes da Nanotecnologia na produção de cosméticos e protectores solares [7], a nível ambiental (nanofiltração de águas [8]) e em catálise química (uso de nanopartículas metálicas para catálise [9]).

As Nanociências são por definição multidisciplinares, envolvendo contribuições da Química, da Biologia, da Física, das Ciências de Materiais, da Medicina, da Engenharia e da Informática. Na interface entre a Bioquímica e a Nanotecnologia surge a Bionanotecnologia, área onde se inclui o trabalho de investigação desenvolvido na presente tese.

A presente tese reflecte estudos de interacções de proteínas com superfícies nanoestruturadas e nanopartículas de metais nobres.

A interacção de proteínas com superfícies nanoestruturadas de prata e ouro é estudada na parte I (**Capítulos 2 e 3**) na qual se utiliza a espectroscopia de ressonância de Raman para estudar a interacção de proteínas contendo cofactores hémicos (citocromos c_3)

com superfícies nanoestruturadas de prata, e a microscopia de força atômica para estudar a interacção de uma enzima (ferroquelatase) com superfícies nanoestruturadas de ouro.

Na parte II (**Capítulos 4, 5 e 6**), é estudada a interacção do citocromo *c* com nanopartículas de ouro formando bionanoconjugados. A perspectiva unificadora subjacente a estes estudos está relacionada com uma abordagem racional no desenvolvimento de biossensores, em que a proteína tem o papel catalítico e de interacção com o analito e o metal nanoestruturado constitui uma superfície privilegiada para adsorção da proteína e transdução de sinal.

1.1.1 Interacção de proteínas com superfícies nanoestruturadas

Os estudos de interacção proteína-superfície têm sido efectuados ao nível da adsorção de moléculas de proteínas em superfícies de metal ou em monocamadas auto-montadas (SAM) à superfície do eléctrodo, para estudo de processos de transferência electrónica em proteínas e controlo das propriedades de superfície a nível químico, biológico e estrutural.

As superfícies metálicas isoladas tendem a adsorver materiais orgânicos que podem alterar as propriedades interfaciais e ter uma influência significativa na estabilidade das nanoestruturas de metal [10], o que é evitado aquando da formação de uma SAM. Estas são amplamente usadas em nanotecnologia, pois proporcionam uma plataforma orgânica bem definida, com funcionalidades químicas controláveis e específicas para a ligação de biomoléculas [11, 12]. As SAM (figura 1.1) são constituídas por uma camada organizada de moléculas com uma espessura típica de 1 a 3 nm, possuem numa extremidade o “grupo de cabeça”, normalmente constituído por tióis, com afinidade específica para o substrato de metal nobre e na outra extremidade o grupo funcional terminal, com várias funcionalidades (catiónica, aniónica, neutra), à qual a proteína ou a enzima se liga.

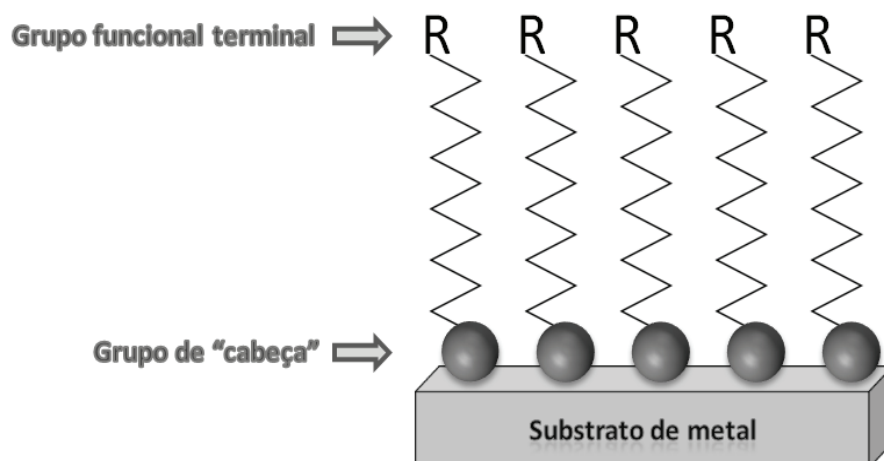


Figura 1.1 Representação esquemática da estrutura de uma monocamada auto-montada (SAM).

A superfície em que a SAM se forma é denominada de substrato, sendo este uma superfície plana, como uma superfície de metal nobre (ouro, prata, paládio, platina, etc) ou uma nanoestrutura (como nanopartículas, nanofios, etc) [10].

O sucesso da imobilização de proteínas na superfície das SAM depende principalmente de três factores:

1. Impedir a adsorção não específica das proteínas ou biomoléculas à superfície (só interações entre moléculas e ligandos de interesse são permitidas);
2. Permitir a modificação da composição e densidade dos ligandos imobilizados ou biomoléculas (proteínas, antígenos, açúcares);
3. Ligandos de interesse deverão ser apresentados numa maneira estruturalmente bem definida de modo a minimizar a influência na superfície.

As SAM servem parcialmente de “barreira” impedindo que as proteínas ou outros ligandos estejam em contacto directo com o metal, o que poderia conduzir a alterações na sua conformação ou mesmo a desnaturação das proteínas.

O sucesso da SAM na superfície de metais nobres é devida a diversos factores, tais como a facilidade no método de preparação da SAM, a estabilidade, reprodutibilidade e confiança das superfícies formadas, assim como a possibilidade de aplicação de uma variedade de técnicas para a sua caracterização.

Podem ancorar-se diferentes grupos funcionais terminais, que ao interagirem com biomoléculas (proteínas, enzimas, anticorpos, ADN) dão origem a um biossensor. Todas

estas propriedades permitem que as SAM sejam aplicadas em áreas como a biologia, bioquímica e electroquímica [10, 12].

1.1.2 Interacção de proteínas com nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNP) são especialmente úteis devido às suas propriedades únicas a nível óptico, electrónico, magnético e catalítico, pela possibilidade de controlo de tamanho, elevadas áreas superficiais disponíveis e fácil funcionalização. Esta funcionalização aumenta a especificidade para a ligação de proteínas, permitindo a formação de bionanoconjugados [13] com diferentes propriedades e funcionalidades e que podem encontrar aplicações em biossensores. Para a preparação de biossensores é essencial imobilizar receptores (proteínas, anticorpos, enzimas ou catalizadores biomiméticos) à superfície de substratos sólidos de modo a detectar moléculas alvo específicas sem necessidade de marcação prévia.

Das aplicações de AuNP em ensaios biológicos, destaca-se o estudo efectuado por Rotello e colaboradores no desenvolvimento de monocamadas mistas com funções aniónicas que protegem as nanopartículas para reconhecimento da superfície e inibição da actividade da α -quimiotripsina [13]. As AuNP encontram também aplicação ao nível da nanomedicina, nomeadamente no desenvolvimento de métodos de diagnóstico clínico, como a detecção específica de sequências de ADN e ARN, mutações e polimorfismos [14, 15], e uso de AuNP como biossensores para detecção de células cancerígenas [16].

A detecção das alterações conformacionais de uma proteína pode ser efectuada por um sensor baseado na alteração de cor provocada por agregação de AuNP [17, 18]. As AuNP foram usadas como sensores de bioreconhecimento e amplificação na detecção de proteínas, como exemplo destaca-se a detecção óptica de complexos de trombina em solução e à superfície por AuNP funcionalizadas [17]. As propriedades ópticas únicas das AuNP foram aplicadas ao desenvolvimento de biossensores que permitem a detecção a olho nu de imunoglobulina G [19]. As interacções de AuNP com enzimas foram usadas como sensores em sistemas bioelectrónicos, como exemplo o sistema bioelectrocatalítico com elevada eficiência de contacto eléctrico entre a glucose oxidase em AuNP funcionalizada e o eléctrodo de suporte [17, 19].

As AuNP funcionalizadas com biomoléculas também foram usadas para a construção de sensores de onda evanescente de fibra óptica, que têm a capacidade de proporcionar selectividade para as moléculas de substrato [19].

Outros exemplos de biossensores baseados nouro tipo de nanopartículas são a utilização de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com antigénios ou anticorpos como sensores imunológicos [19] e o uso de nanopartículas de polímeros fluorescentes para detecção e identificação de proteínas com aplicação em diagnósticos biomédicos [20].

Os biossensores têm sido extensivamente aplicados e desenvolvidos em nanotecnologia, exibindo cada vez mais maior funcionalidade, sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade.

1.1.3 Citocromos do tipo c

Os citocromos são proteínas que contêm como co-factor um anel porfirínico ligado a um átomo de ferro central, designado por grupo hemo (figura 1.2), que tem um papel essencial em reacções de transferência electrónica. O estado de oxidação do ferro varia entre o estado reduzido (Fe^{2+}) e o estado oxidado (Fe^{3+}), ocorrendo assim a transferência de um electrão. O átomo de ferro forma um complexo hexacoordenado com quatro ligações no plano equatorial aos átomos de azoto do anel porfirínico sendo as posições de coordenação axiais asseguradas por resíduos laterais de aminoácidos da cadeia polipeptídica, geralmente histidina ou metionina.

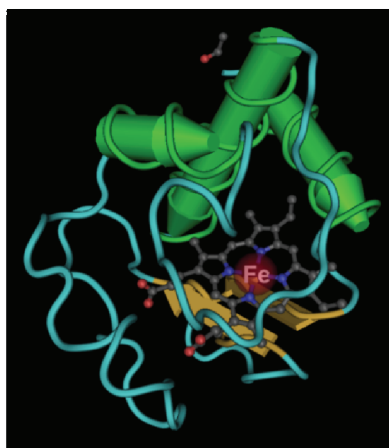


Figura 1.2 Estrutura do citocromo c com evidência do grupo hemo. Código de acesso PBD: 1 HRC.

Os citocromos distinguem-se pelo tipo de hemo, natureza da cadeia polipeptídica e características espectrais. Apresentam uma banda intensa de absorção no espectro de UV-visível devido à presença do grupo hemo, denominada banda de Soret e detectada a cerca de 410 nm, assim como uma família de bandas menos intensas na região 550-600 nm denominadas bandas Q [21].

Das três classes distintas de citocromos (*a*, *b* e *c*) foram estudados os citocromos do tipo *c*.

O citocromo *c* é um componente essencial da cadeia respiratória mitocondrial, actuando como transportador electrónico entre o citocromo *c* reductase e o citocromo *c* oxidase, o que permite que seja usado como proteína modelo para estudos de transferência electrónica [22, 23]. A sua estrutura tridimensional foi determinada por cristalografia de raios-X (figura 1.2), revelando a presença de uma região rica em lisinas com carga positiva a valores de pH fisiológico [24]. A proteína pode ser facilmente obtida na sua forma pura e mantém-se estável em solução, sendo resistente à desnaturação e a alterações da sua estrutura tridimensional nativa em condições adversas de pH, temperatura e força iónica [25].

Em termos de cofactor, os citocromos do tipo *c* possuem um grupo hemo ligado covalentemente à cadeia polipeptídica pela ligação tioéter com dois resíduos de cisteína da sequência de aminoácidos [26], em oposição aos hemos do tipo *b* característicos da mioglobina e hemoglobina, em que o hemo não está ligado covalentemente à cadeia polipeptídica.

O grupo hemo do citocromo *c* apresenta no seu estado nativo coordenação axial com histidina (His) 18 e metionina (Met) 80. Na forma alcalina obtida a pH superior a 8 o ligando axial de Met desliga-se do ferro e é substituído por um resíduo de lisina (Lys72 ou 73 ou 79) [23, 27]. Na forma ácida presente abaixo de pH 4 ocorre uma alteração no ferro do hemo do estado de spin baixo para spin alto em que uma molécula de água substitui a Met 80, que se desliga do ferro [28].

1.1.4 Tipos de interacção entre proteínas e superfícies metálicas

A interacção entre as proteínas e as superfícies nanoestruturadas e nanopartículas de metais nobres pode ocorrer por ligações não covalentes (electrostáticas, ligações por pontes de hidrogénio ou por forças do tipo Van der Waals) que não causam, em princípio, alterações significativas na conformação da proteína. A ligação pode também ser do tipo covalente, que pode conduzir a alterações na conformação e funcionalidade da proteína.

As ligações covalentes entre proteínas e ouro metálico, ocorrem principalmente pela ligação entre resíduos de aminoácidos com grupos tiol (por exemplo, o resíduo de cisteína) e o ouro, dada a elevada afinidade entre o enxofre e o ouro. Outra estratégia de imobilização de proteínas que tem sido aplicada principalmente à ligação de anticorpos a superfícies metálicas, consiste na formação de ligações covalentes entre SAM apresentando funcionalidades reactivas e as proteínas em causa. Constitui um exemplo deste tipo de abordagem o acoplamento químico com EDC/NHS de grupos amina da superfície da proteína a uma SAM apresentando grupos de ácido carboxílico.

1.1.5 Efeitos na conformação da proteína

As alterações na conformação da proteína podem ocorrer ao nível da sua estrutura secundária. A estrutura secundária contribui para a estabilização da conformação global da proteína. Tem como elementos predominantes a hélice α e a folha β e elementos mais simples, volta β (“ β turn”) e espiral aleatória (“random coil”).

A hélice α é composta por uma cadeia polipeptídica com uma forma em hélice estabilizada por pontes de hidrogénio. Com excepção do grupo amina do primeiro resíduo e do grupo carboxilo do último resíduo, todos os grupos amina e carboxilo da cadeia principal da hélice α formam pontes de hidrogénio. É uma estrutura compacta, com um enrolamento para a direita, em que os resíduos de aminoácidos podem formar faces hidrofílicas e faces hidrofóbicas.

A conformação β é constituída por cadeias β numa topologia em folha, com a denominação de folhas β . Formada por sequências polipeptídicas, distingue-se da hélice α , uma vez que é constituída por duas ou mais cadeias β unidas por pontes de hidrogénio e

com uma estrutura estendida. Podem designar-se folhas β paralelas, quando duas cadeias seguem no mesmo sentido N-terminal-C-terminal e folhas β antiparalelas quando seguem em sentidos opostos, ou folhas β mistas quando contêm grupos de cadeias β paralelas e antiparalelas [21].

Por último, as voltas β ligam duas folhas β com quatro resíduos de aminoácidos; e a espiral aleatória define zonas desordenadas da estrutura secundária [21].

Para a caracterização das interacções de proteínas com superfícies nanoestruturadas e nanopartículas de metais nobres, utilizaram-se no presente estudo técnicas espectroscópicas, microscópicas e de dispersão de luz, cujos princípios se apresentam sucintamente em seguida.

1.2 Técnicas para a Caracterização da Interação de Proteínas com Superfícies Nanoestruturadas e Nanopartículas de Metais Nobres

1.2.1 Medidas de Espectroscopia

1.2.1.1 Espectroscopia de Ressonância de Raman (RR) e Espectroscopia de Ressonância de Raman Aumentada pela Superfície (SERRS)

As espectroscopias de infravermelho (IR) e de Raman pertencem ao grupo das espectroscopias vibracionais, baseando-se em transições entre estados energéticos vibracionais da molécula induzidas pela radiação electromagnética incidente. Quando as transições para estados excitados vibracionais são alcançadas pela absorção directa da luz na região do infravermelho, denomina-se por espectroscopia de IR. Na espectroscopia de IR, o fóton absorvido promove o electrão a um estado vibracional superior e o electrão decai por um processo não radiativo para um nível vibracional inferior.

Quando se aplica ao sistema radiação com uma energia superior à de IR, pode ocorrer dispersão. O fóton interage com a matéria e seguidamente deixa de interagir, com

um decaimento radiativo com a mesma energia (dispersão elástica ou de Rayleigh); ou com menor energia (dispersão inelástica ou de Raman). A espectroscopia de IR permite detectar somente transições que causam alterações no dipolo da molécula, enquanto a espectroscopia de Raman detecta somente transições que causam alterações de polarizabilidade na molécula [29, 30], sendo assim duas técnicas complementares de espectroscopia vibracional.

Na espectroscopia de Raman, se a energia da radiação electromagnética incidente sobre a amostra for muito mais elevada, pode ocorrer uma transição electrónica sendo o sinal de Raman intensificado até 6 ordens de grandeza, denominado Ressonância de Raman [29-31], como representado na figura 1.3.

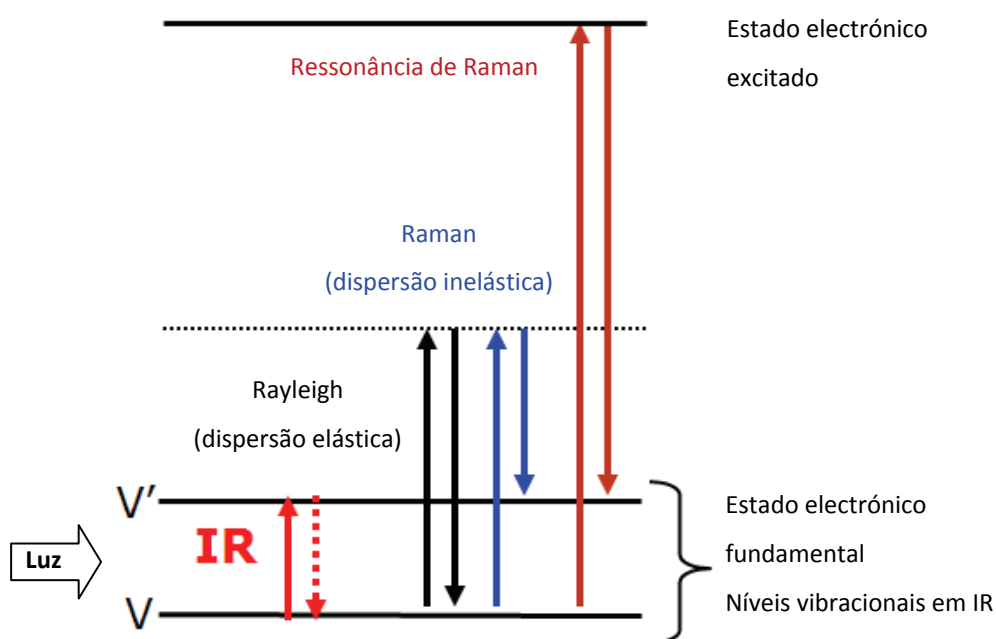


Figura 1.3 Transições electrónicas observadas nas espectroscopias de infravermelho (IR) e de Raman (adaptado da referência [30]).

Assim, a espectroscopia de ressonância de Raman (RR) é uma técnica associada à espectroscopia de Raman tradicional, mas muito mais sensível que esta, permitindo a análise de amostras biológicas muito diluídas.

A espectroscopia de RR é especialmente útil para a análise selectiva de vibrações associadas a cromóforos específicos como por exemplo vibrações provenientes de hemos em citocromos, sendo que a análise das frequências vibracionais do cromóforo em

ressonância confere informação da geometria de coordenação do metal e ambiente do ligando [31].

A espectroscopia de ressonância de Raman aumentada pela superfície (SERRS) é uma técnica espectroscópica ainda mais sensível e selectiva do que a espectroscopia de RR. Permite detectar moléculas únicas, estudar analitos em superfícies de metal rugoso (usualmente prata, ouro ou cobre), ou imobilizados em SAM à superfície do metal, uma vez que as superfícies metálicas rugosas intensificam o sinal de Raman de moléculas adsorvidas por um factor de cerca de 10^5 vezes [31], permitindo portanto a utilização de amostras com uma concentração 10^5 vezes menor.

Acoplada com métodos electroquímicos a SERRS permite a realização de estudos de transferência electrónica e fornece informação sobre os processos de transferência electrónica de proteínas imobilizadas em eléctrodos metálicos, ou imobilizadas em SAM de alcanotóis à superfície desses eléctrodos, tal como analisado no presente estudo.

1.2.1.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de CD permite analisar a estrutura secundária e terciária de proteínas, as alterações estruturais nela ocorrentes, a estabilidade dos fragmentos da proteína, assim como a integridade e enrolamento da mesma [32]. Esta técnica baseia-se na determinação da diferença na absorvância da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, em função do comprimento de onda [33].

A região do ultravioleta (UV) longínquo de 190 a 260 nm corresponde à absorção das ligações amida da cadeia peptídica da proteína, sendo o espectro de CD analisado em termos de estrutura secundária. Cada conformação das proteínas/péptidos (hélice α , folha β , volta β e espiral aleatória) apresenta um espectro típico de CD, como se pode observar na figura 1.4.

O espectro de CD na região de UV próximo (260 a 320 nm) reflecte as cadeias de aminoácidos aromáticos e proporciona informação sobre a estrutura terciária da proteína [33].

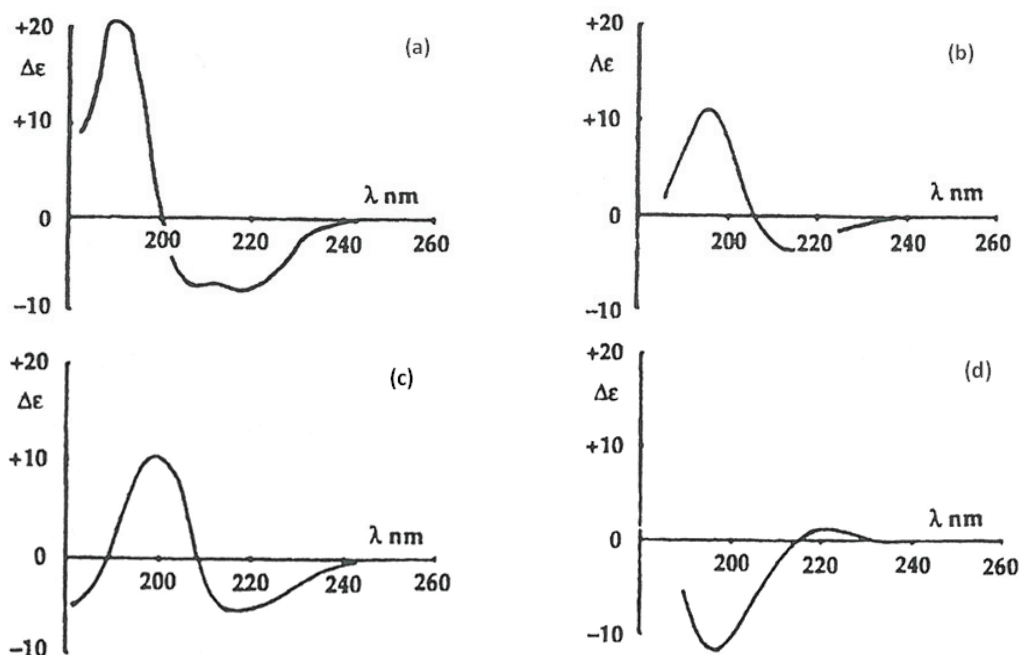


Figura 1.4 Espectros de CD característicos de diferentes conformações da cadeia polipeptídica **(a)** hélice α ; **(b)** folha β ; **(c)** volta β (“ β turn”) e **(d)** espiral aleatória (“random coil”) (adaptado da referência [33]).

Os dados espectroscópicos de CD podem ser analisados a partir do servidor DICHROWEB, com o auxílio de algoritmos de determinação de estrutura secundária como CDSSTR, CONTINLL, SELCON3, VARSLC e K2d [34], que permitem o cálculo do conteúdo de estrutura secundária e uma análise gráfica, comparando os dados experimentais com espectros de proteínas previamente conhecidos [35].

Pela técnica espectroscópica de CD foi analisado neste trabalho a estrutura secundária das proteínas ao nível do seu conteúdo nas conformações em hélice α , folha β e espiral aleatória (“random coil”).

1.2.2 Medidas de Microscopia

1.2.2.1 Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM)

A microscopia electrónica de transmissão (TEM) permite visualizar a estrutura de materiais de origem biológica e não biológica, embora não seja a mais adequada para a visualização dos primeiros materiais, dado que não define zonas de baixa densidade electrónica, tal como matéria orgânica, sem o auxílio de técnicas de marcação, por exemplo, com ouro coloidal ou sais de urânio. A técnica permite examinar detalhes finos de estrutura interna, como os planos atómicos individuais (no caso de TEM de alta resolução) e observar a microestrutura e a morfologia com resolução, ao nível de nanómetros, de diversos materiais como metais, cerâmica, polímeros, entre outros [36].

Na TEM um feixe de electrões incide numa amostra de fina espessura, interage com ela e é transmitido através da amostra, com uma distribuição de intensidade e direcção controlada pelas leis de difracção impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. A interacção dos electrões transmitidos através da amostra é transformada numa imagem de TEM, que pode ser posteriormente analisada [36].

Na presente tese esta técnica microscópica foi usada de forma complementar para a determinação do diâmetro médio de AuNP e bionanoconjugados Cyt *c*-AuNP. Pela elevada densidade electrónica do ouro esta técnica é particularmente relevante para a visualização de nanopartículas deste metal.

1.2.2.2 Microscopia de Força Atómica (AFM)

A microscopia de força atómica (AFM) é uma técnica de microscopia de varrimento de sonda (SPM) que permite estudar com elevada resolução (ao nível de nanómetros) estruturas macromoleculares em condições fisiológicas, distribuição de átomos e moléculas à superfície, permite analisar a topografia da superfície em imagens reais a três dimensões, assim como analisar biomoléculas ligadas à superfície através de, por exemplo, SAM contendo diferentes grupos terminais.

A AFM tem sido extensivamente aplicada em estudos nas áreas de ciências da vida, ciências de materiais, nanotecnologia, electroquímica, no que respeita a análise de proteínas, enzimas, ADN, ARN, polímeros, metais, nanopartículas, entre outros [37].

Em AFM ocorre a interacção da superfície com uma ponta aguçada normalmente de silício montada em braços (“cantilevers”) rectangulares, que funciona como uma mola sensível a pequenas variações de força. A interacção em função da distância entre a ponta e a amostra determina o modo de funcionamento deste tipo de microscopia, podendo ser considerados três modos distintos: modo de contacto, não-contacto e modo intermitente (“tapping”).

Para a análise de materiais maleáveis e facilmente deformáveis pela ponta, como materiais biológicos e polímeros, o modo intermitente é o frequentemente usado. A ponta oscila a uma elevada frequência (aproximadamente 300 KHz) com grande amplitude e contacta com a superfície após um ciclo de oscilação [38-40].

Nesta tese a AFM foi a técnica escolhida para o estudo da imobilização de uma enzima em SAM à superfície de ouro e para comprovar a formação de bionanoconjugados Cyt c-AuNP.

1.2.3 Medidas de Dispersão de Luz

As medidas de dispersão de luz utilizadas no presente trabalho de investigação englobaram as medidas de dispersão de luz dinâmica (DLS) e as medidas de potencial zeta (ζ -potencial).

1.2.3.1 Medidas de Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)

A dispersão de luz dinâmica (DLS) é uma técnica de dispersão de luz adequada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico de partículas com dimensões na ordem dos nanómetros, podendo mesmo determinar tamanhos inferiores a 1 nm, dependendo do equipamento. Esta técnica pode ser aplicada à determinação de tamanhos ou distribuição de tamanhos de proteínas, nanopartículas, polímeros, micelas, hidratos de carbono, emulsões, entre outros.

As partículas possuem movimento aleatório, designado por movimento Browniano. Ao serem iluminadas com um laser, a intensidade de luz dispersa é dependente do tamanho das partículas, as mais pequenas movem-se mais rapidamente e as maiores movem-se mais lentamente. A DLS mede a intensidade de flutuação do movimento Browniano das partículas e relaciona-o com o tamanho das mesmas, através da equação de Stokes-Einstein (equação 1), sendo determinado o seu diâmetro hidrodinâmico, $d(H)$.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

$d(H)$ descreve o diâmetro hidrodinâmico, D o coeficiente de difusão translacional, k a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta e η a viscosidade.

O $d(H)$ obtido é o diâmetro da esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão translacional que o da partícula. O coeficiente de difusão translacional está dependente do tamanho do núcleo da partícula, da estrutura da superfície, concentração e tipo de iões do meio, o que afecta a velocidade de difusão das partículas [41, 42].

Neste estudo a DLS foi usada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico dos bionanoconjugados Cyt c-AuNP e avaliação da cobertura de superfície das AuNP pela proteína.

1.2.3.2 Medidas de Potencial Zeta (ζ -potencial)

O potencial zeta é o potencial electrostático gerado pela acumulação de iões na superfície da partícula. É aplicado na determinação da carga de superfície de partículas como nanopartículas, proteínas, lipossomas, entre outros.

A superfície da partícula está organizada numa dupla camada eléctrica, composta pela região interna ou camada de Stern (em que os iões estão fortemente ligados à superfície) e a região externa ou camada difusa (em que os iões estão ligados à superfície de um modo mais fraco). Dentro da camada difusa existe uma fronteira em que os iões e as

partículas formam uma entidade estável, denominada de plano deslizante e o potencial existente nesta fronteira é designado de potencial zeta, como ilustra a figura 1.5.

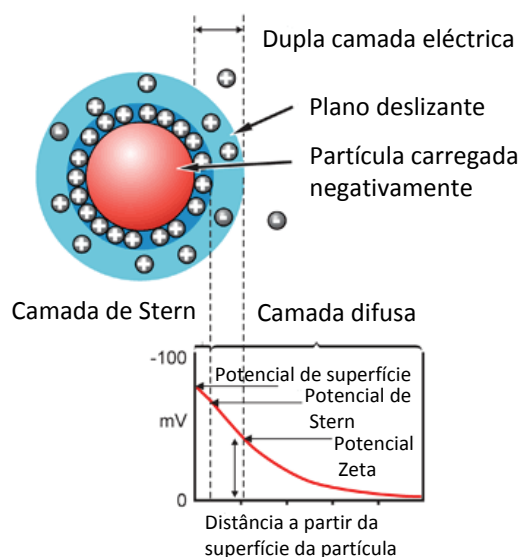


Figura 1.5 Representação esquemática do potencial zeta (adaptado da referência [42]).

Quando o campo eléctrico interage com as partículas carregadas, estas são atraídas para o eléctrodo de carga oposta. A velocidade da partícula mediante o campo eléctrico refere-se à mobilidade electroforética. O ζ -potencial está relacionado com a mobilidade electroforética pela equação de Henry (equação 2).

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta}{3 \eta} f(kR) \quad (2)$$

U_E é a mobilidade electroforética, ε e η são a constante dieléctrica e a viscosidade do solvente, respectivamente, ζ é o potencial zeta e $f(kR)$ a função de Henry.

Dois valores são normalmente usados como aproximações para $f(kR)$. Se o cálculo do potencial zeta for efectuado para sistemas aquosos, $f(kR)$ é igual a 1,5 referindo-se à aproximação de Smoluchowski, se no entanto for efectuado para sistemas não aquosos, $f(kR)$ é igual a 1,0 e refere-se à aproximação de Huckel [42, 43].

Neste trabalho o potencial zeta permitiu comprovar a formação e analisar o efeito do pH em bionanoconjugados Cyt c-AuNP.

1.3 Bibliografia

- [1] Schmid, G. *Nanoparticles: From Theory to Application*; WILEY-VCH, Weinheim, 2004.
- [2] Baptista, P. V.; Koziol-Montewka, M.; Paluch-Oles, J.; Doria, G.; Franco, R. *Clin. Chem.* **2006**, 52, 1433-1434.
- [3] Tran, P. A.; Sarin, L.; Hurt, R. H.; Webster, T. J. *J. Mater. Chem.* **2009**.
- [4] Kayacan, O.; Bulgun, E. Y. *Defence Science Journal* **2005**, 55, 195-205.
- [5] Hinestroza, J. P. *materialstoday*, **2007**, 10, 56.
- [6] Reza, M. M.; Chad, J.; Hatziantoniou, S.; Demetzos, C. *Journal of Liposome Research* **2008**, 18, 309-327.
- [7] Brayner, R. *nanotoday* **2008**, 3, 48-55.
- [8] Hillie, T.; Hlophe, M. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 663-664.
- [9] Jianrong, C.; Yuqing, M.; Nongyue, H.; Xiaohua, W.; Sijiao, L. *Biotechnology Advances* **2004**, 22, 505-518.
- [10] Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem Rev.* **2005**, 105, 1103-1169.
- [11] Smalley, J. F.; Chalfant, K.; Feldberg, S. W. *J. Phys. Chem B* **1999**, 103, 1676-1685.
- [12] Du, D.; Ding, J.; Cai, J.; Zhang, J.; Liu, L. *Talanta* **2008**, 74, 1337-1343.
- [13] You, C.-C.; Verma, A.; Rotello, V. M. *Soft Matter* **2006**, 2, 190-204.
- [14] Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 943-950.
- [15] Thaxton, C. S.; Georganopoulou, D. G.; Mirkin, C. A. *Clin. Chim. Acta* **2006**, 363, 120-126.
- [16] El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A. *Nano Lett.* **2005**, 5, 829-834.
- [17] You, C. C.; De, M.; Rotello, V. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 639-646.
- [18] Chah, S.; Hammond, M. R.; Zare, R. N. *Chemistry & Biology* **2005**, 12, 323-328.
- [19] Katz, E.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6042-6108.
- [20] You, C. C.; Miranda, O. R.; Gider, B.; Ghosh, P. S.; Kim, I. B.; Erdogan, B.; Krovi, S. A.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 318-323.
- [21] Quintas, A.; Freire, A. P.; Halpern, M. J. *Bioquímica, Organização Molecular da Vida*; Lidel - Edições Técnicas, Lisboa, Portugal, 2008.
- [22] Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4062-4068.

- [23] Banci, L.; Bertini, I.; Rosato, A.; Varani, G. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 824-837.
- [24] Rieder, R.; Bosshard, H. R. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 4732-4739.
- [25] Scott, R. A.; Mauk, A. G. *Cytochrome c: A multidisciplinary approach*; University Science Books: Sausalito, CA, 1995.
- [26] Cowley, A. B.; Lukat-Rodgers, G. S.; Rodgers, K. R.; Benson, D. R. *Biochemistry* **2004**, *43*, 1656-1666.
- [27] Assfalg, M.; Bertini, I.; Dolfi, A.; Turano, P.; Mauk, A. G.; Rosell, F. I.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2913-2922.
- [28] Varhac, R.; Antalík, M. *Biochemistry* **2004**, *43*, 3564-3569.
- [29] Kellmer, R.; Mermet, J. M.; Otto, M.; Widmer, H. M.; Eds.; *Analytical Chemistry*; WILEY-VCH, Weinheim, 1998.
- [30] Spiro, T. G.; Czernuszewicz, R. S. *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism*; Lawrence Que, Jr.; Ed.; University Science Books, CA, 2000.
- [31] Withnall, R. *Protein-Ligand Interactions: structure and spectroscopy*; Harding, S. E.; Chowdhry, B. Z.; Eds.; Oxford University Press Inc., New York, 2001.
- [32] Kelly, S. M.; Price, N. C. *Current Protein and Peptide Science* **2000**, *1*, 349-386.
- [33] Drake, A. F. *Protein-Ligand Interactions: structure and spectroscopy*; Harding, S. E.; Chowdhry, B. Z.; Eds.; Oxford University Press Inc., New York, 2001.
- [34] Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Biopolymers* **2008**, *89*, 392-400.
- [35] Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, 668-673.
- [36] Sickafus, K. E. *Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films*; Brundle, R. C.; Evans, Jr. C. A.; Wilson, S.; Eds.; Maining Publications Co., U.S.A, 1992.
- [37] Gaczynska, M.; Osmulski, P. A. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2008**, *13*, 351-367.
- [38] Gadegaard, N. *Biotechnic & Histochemistry* **2006**, *81*, 87-97.
- [39] Friedbacher, G.; Fuchs, H. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1337-1357.
- [40] Braga, P. C.; Ricci, D. *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications*; Human Press Inc., Totowa, NJ, 2004.
- [41] Jachimska, B.; Wasilewska, M.; Adamczyk, Z. *Langmuir* **2008**, *24*, 6866-6872.
- [42] <http://www.malvern.co.uk>, Technical note, Malvern Instruments.

- [43] Dougherty, G. M.; Rose, K. A.; Tok, J. B.-H.; Pannu, S. S.; Chuang, F. Y. S.; Sha, M. Y.; Chakarova, G.; Penn, S. G. *Electrophoresis* **2008**, 29, 1131-1139.

PARTE I. Interacção de Proteínas com Superfícies Nanoestruturadas de Prata e Ouro



CAPÍTULO 2

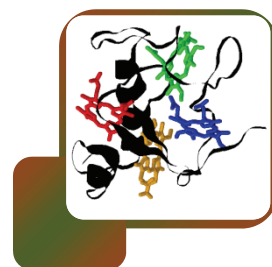
ESTUDO POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA DE RAMAN DA TRANSFERÊNCIA
ELECTRÓNICA EM CITOCROMOS C_3 ADSORVIDOS A ELÉCTRODOS DE PRATA



CAPÍTULO 3

IMOBILIZAÇÃO DA FERROQUELATASE EM MONOCAMADAS
AUTO-MONTADAS À SUPERFÍCIE DE OURO

CAPÍTULO 2. ESTUDO POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA DE RAMAN
DA TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA EM CITOCROMOS C_3 ADSORVIDOS A
ELÉCTRODOS DE PRATA



2.1 Introdução

A Espectroscopia de Ressonância de Raman (RR) é uma ferramenta eficaz para estudos estruturais e dinâmicos das proteínas hémicas. Em particular, a Espectroscopia de Ressonância de Raman Aumentada pela Superfície (SERRS) tem sido aplicada com sucesso ao estudo da transferência electrónica em proteínas hémicas adsorvidas a monocamadas auto-montadas (SAM) formadas à superfície de eléctrodos de prata [1-4].

As SAM proporcionam uma superfície biologicamente favorável à adsorção de proteínas e assemelham-se a membranas fosfolipídicas, evitando alterações estruturais irreversíveis na proteína imobilizada [4].

A SERRS apresenta grande selectividade, proporcionando o espectro vibracional do grupo hémico apenas para as proteínas adsorvidas, além de informação dinâmica dos sítios redox durante o processo interfacial [2, 5].

O citocromo c tem sido a proteína hémica utilizada como modelo nos estudos de SERRS, devido ao interesse no estudo da estrutura desta proteína e das suas propriedades de transferência electrónica quando adsorvida a eléctrodos de prata [1].

Neste capítulo apresenta-se o estudo da transferência electrónica do citocromo c_3 do Tipo II adsorvido a SAM de ácido mercaptoundecanóico ou de neoglicoconjugado de maltose à superfície de eléctrodos de prata, pela aplicação de SERRS. O mesmo estudo foi aplicado ao citocromo c_3 do Tipo I, para comparação.

Os citocromos c_3 estudados são proteínas tetra-hémicas de baixa massa molecular (cerca de 13,5 a 15 kDa), isoladas a partir de uma bactéria redutora de sulfato do género *Desulfovibrio*. Actuam nas reacções de transferência electrónica e têm um papel fundamental na transdução de energia biológica [6, 7]. Os citocromos c_3 apresentam quatro grupos hémicos ligados covalentemente por ligações tioéter a resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica e uma coordenação axial bis-histidina [6].

O citocromo c_3 do Tipo II (TpII- c_3) foi obtido a partir de fracções membranares da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough e a sua estrutura tridimensional foi resolvida por difracção de raios-X [8, 9]. A molécula de TpII- c_3 apesar de apresentar uma estrutura tridimensional praticamente idêntica ao citocromo c_3 do Tipo I (TpI- c_3), apresenta diferente distribuição de carga à superfície e diferentes papéis fisiológicos [8]. O TpI- c_3 encontra-se nas fracções citoplasmáticas da mesma bactéria e também contém

quatro hemos do tipo *c*, é uma proteína abundante e tem sido extensivamente estudada como modelo deste tipo de citocromos tetra-hémicos [8].

A SAM de ácido mercaptoundecanóico (C_{11} -ácido) tem sido amplamente usada no estudo do equilíbrio redox de proteínas hémicas, nomeadamente do citocromo *c* monohémico [4] e Tpl- c_3 [10, 11]. Esta monocamada foi analisada para comparação com a SAM de maltose, em que foi investigada a possibilidade deste neoglicoconjugado funcionalizado com o grupo tiol (C_{11} -maltose) [12] formar uma SAM à superfície do eléctrodo de prata, para o estudo espectroelectroquímico de proteínas.

A SAM de ácido forma-se à superfície do eléctrodo de prata através da ligação covalente (-SAg), como é visível na figura 2.1 e interage com os citocromos adsorvidos via interacções electrostáticas, entre os grupos carboxilato (COO^-) e a carga positiva da região rica em lisinas da proteína [13, 14].

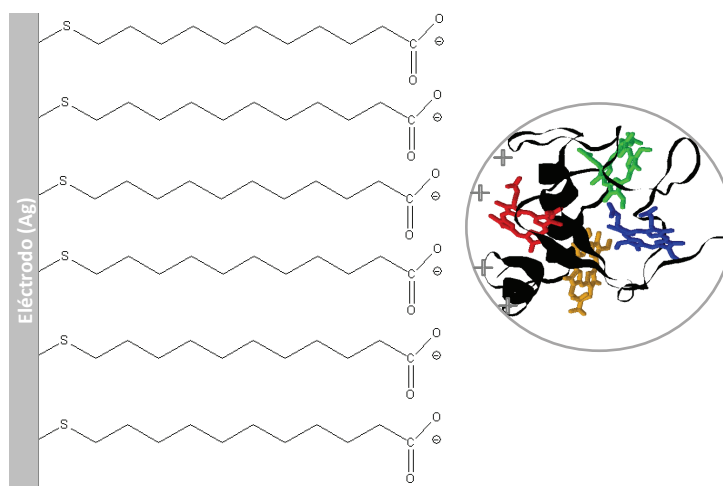


Figura 2.1 Representação esquemática do citocromo c_3 adsorvido na SAM de C_{11} -ácido que reveste o eléctrodo de prata.

Os hidratos de carbono (como a maltose, lactose, glucose) têm um importante papel na adesão e comunicação celular, ligam-se a proteínas como por exemplo selectinas e galectinas, estando envolvidos em processos patológicos e fisiológicos, como inflamações, infecções, metástases e embriogénese. As interacções dos hidratos de carbono são caracterizadas pela forte dependência de catiões divalentes (Ca^{2+}), elevada especificidade e baixa afinidade, que é compensada por ligandos multivalentes [15, 16].

A SAM de maltose foi utilizada devido à sua novidade em estudos electroquímicos de proteínas hémicas, apresentando a vantagem adicional da interacção ser independente do pH, pois pode estabelecer múltiplas ligações de hidrogénio com a proteína, ao contrário da SAM de ácido que na sua forma desprotonada interage predominantemente por efeitos electrostáticos.

Os ligandos tiolados (figura 2.2 a) que formam a SAM de maltose ligam-se à superfície do eléctrodo de prata através de uma ligação covalente (-SAg), formando SAM estáveis e altamente ordenadas, como previamente demonstrado por AFM para uma superfície de ouro [17]. Este ligando pode formar SAM mistas com propriedades de adsorção ideais para as proteínas [18] e possivelmente interage com as proteínas adsorvidas por pontes de hidrogénio e/ou empacotamento hidrofóbico entre a maltose e as cadeias laterais de aminoácidos da proteína [19]. Representa-se esquematicamente na figura 2.2 b a SAM de maltose com o citocromo c_3 adsorvido à sua superfície.

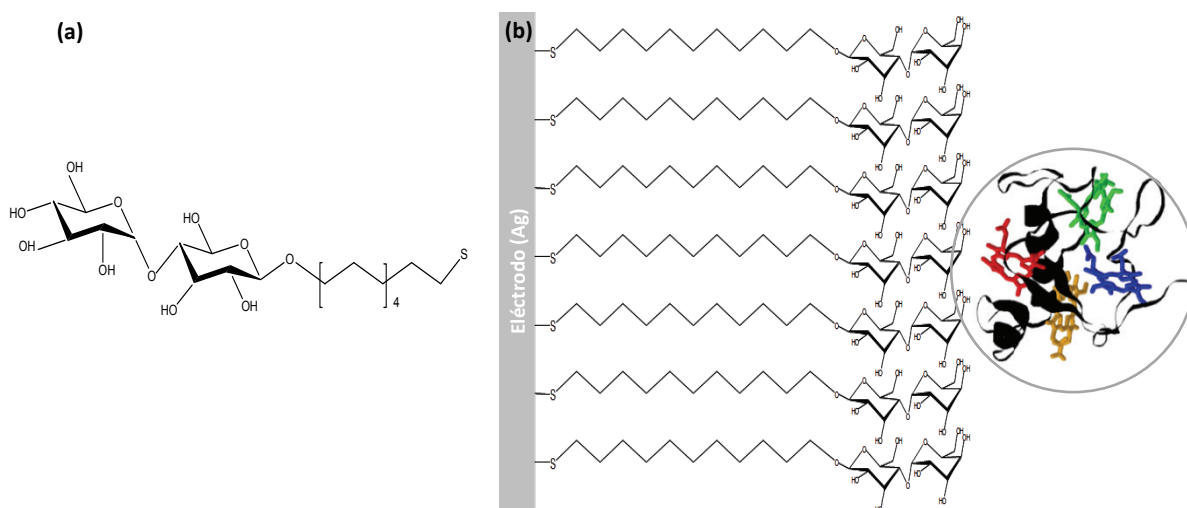


Figura 2.2 (a) Estrutura química do neoglicoconjugado de maltose e **(b)** Representação esquemática do citocromo c_3 adsorvido na SAM de C_{11} -maltose que reveste o eléctrodo de prata.

Os resultados electroquímicos de SERRS do presente estudo mostraram a existência de interacção entre os citocromos c_3 e as SAM, sendo que a interacção entre as proteínas e a SAM de maltose que recobre o eléctrodo de prata ocorre com grande afinidade, permitindo a determinação dos potenciais de redução dos quatro hemos do TplI- c_3 e Tpl- c_3 . A

monocamada de maltose demonstrou um melhor desempenho electroquímico em comparação com a SAM de ácido.

Parte do trabalho de investigação desenvolvido neste capítulo encontra-se publicado [20].

2.2 Procedimento Experimental

2.2.1 Preparação dos citocromos c_3

O Tpl- c_3 de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough foi purificado a partir do respectivo extracto bacteriano, como previamente descrito [21] e o TplI- c_3 recombinante foi purificado a partir do extracto bacteriano de *Escherichia coli* (*E. coli*) onde se encontra sobreexpresso [20].

O processo de purificação para ambas as proteínas foi efectuado pela Doutora Patrícia M. Pereira, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa.

2.2.2 Monocamadas auto-montadas de ácido mercaptoundecanóico ou neoglicoconjugado de maltose

O ácido 11-mercaptoundecanóico ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$, grau de pureza de 95%) foi obtido comercialmente a partir da Sigma-Aldrich e usado sem purificação adicional.

O neoglicoconjugado de maltose, 11-mercpto-undecanil- β -maltósido ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}$ -maltose) foi sintetizado e purificado como descrito no apêndice I.

2.2.3 Medidas de Espectroscopia de Raman

Os espectros de Raman foram medidos à temperatura ambiente, com um laser de Kr^+ (Coherent Innova 320) a um comprimento de onda de excitação de 413 nm e com uma potência de cerca de 40 mW na amostra. A luz dispersa foi detectada perpendicularmente

ao feixe de excitação e focada no feixe de entrada do duplo monocromador (ISA U1000) trabalhando como um espectrógrafo e equipado com câmara CCD arrefecida com azoto líquido.

A resolução espectral do sistema espectroscópico foi de 3 cm^{-1} , o comprimento de onda por cada ponto $0,5\text{ cm}^{-1}$ e o tempo de acumulação total do espectro de 15 s.

Os espectros de SERRS foram medidos usando um eléctrodo rotacional de forma a evitar a degradação da proteína causada pela irradiação do laser. A célula electroquímica foi extensivamente purgada pelo contínuo fluxo de árgon, para que esteja isenta de oxigénio.

Os eléctrodos de prata activados (como descrito em apêndice II) foram imersos numa solução de C_{11} -ácido ou C_{11} -maltose a 2 mM em etanol absoluto (grau de pureza de 99,8%, Riedel-de-Haën) durante a noite. Os eléctrodos com a SAM formada foram enxaguados suavemente com etanol, água destilada e secos com árgon. Os eléctrodos modificados foram colocados na célula electroquímica contendo uma solução tampão de Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, glicerol a 10% e K_2SO_4 a 12,5 mM (preparada em água bi-destilada fervida e sob árgon, para remoção de oxigénio) e adicionaram-se 10 μL da proteína para uma concentração final em proteína de aproximadamente 0,1 μM . A esta concentração de proteína, somente o aumento de sinal a partir da proteína adsorvida pode ser detectado.

Para as experiências de RR, as proteínas foram preparadas numa concentração de 50 μM na mesma solução tampão das experiências de SERRS, e medidas num tubo de RMN, num sistema Raman 101 (Princeton Photonics), com rotação, para evitar o aquecimento e a fotorredução da amostra. A solução de proteína totalmente reduzida foi obtida pela adição de ditionito de sódio (Sigma) à amostra desarejada.

O fluxo de árgon foi mantido durante as experiências e os espectros analisados na região de alta frequência de 1250 a 1600 cm^{-1} . Cada experiência foi repetida três vezes para garantir a reprodutibilidade dos resultados e as medidas foram efectuadas no laboratório de Espectroscopia de Raman do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa.

2.2.4 Tratamento de Resultados

Os espectros foram analisados usando uma desconvolução em bandas Lorentzianas, pelo utilitário disponível comercialmente PeakFit v.4.12 (Seasolve Software Inc.). Os ajustes aos espectros foram realizados com todos os parâmetros livres: largura, centro e amplitude de cada banda Lorentziana, assim como o declive e a intercepção da linha de base.

A determinação dos potenciais de redução para os quatro hemo dos citocromos c_3 foi efectuada usando equações de ajuste no utilitário Origin 6.0. Este procedimento é descrito na secção 2.3.4.

2.3 Resultados

2.3.1 Medidas de Espectroscopia de Ressonância de Raman (RR)

Os espectros de Ressonância de Raman (RR) de ambos os citocromos c_3 em solução foram analisados nos estados totalmente oxidado ou reduzido, para a determinação dos componentes individuais dos espectros.

A figura 2.3 ilustra os espectros de RR do TplI- c_3 em solução totalmente oxidado ou reduzido. O intervalo espectral inclui as bandas marcadoras ν_4 , ν_3 e ν_2 [22]. As frequências das bandas estão associadas ao estado de oxidação do ferro (ν_4), ao estado de spin e à coordenação do ferro no hemo (ν_3 e ν_2) [14].

O TplI- c_3 nos estados totalmente oxidado ou reduzido revela bandas marcadoras características de uma configuração hexacoordenada de spin baixo para o ião ferro. O TplI- c_3 em solução nos estados totalmente oxidado ou reduzido apresenta bandas marcadoras de RR em posições idênticas às apresentadas para TplI- c_3 , como mostra a tabela 2.1, e idênticas às descritas na literatura [10].

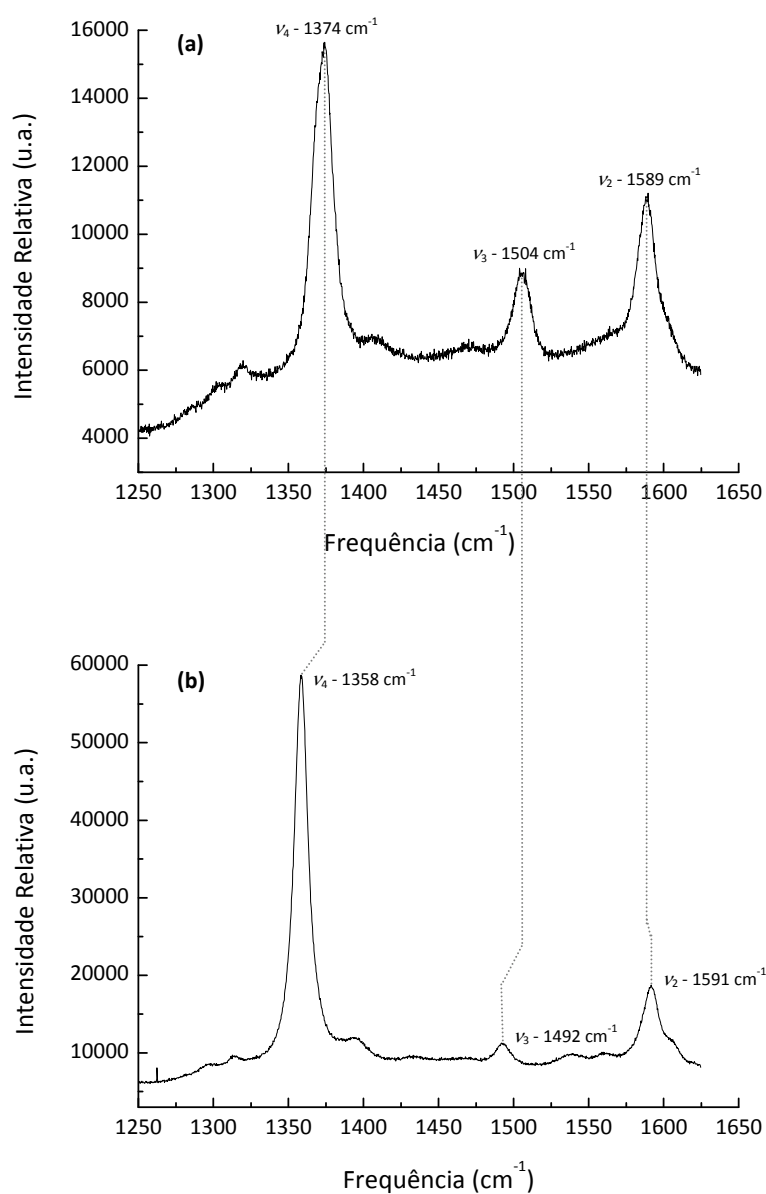


Figura 2.3 Espectros de RR do TplI- c_3 em solução **(a)** no estado oxidado e **(b)** no estado reduzido.

Tabela 2.1 Parâmetros espectrais de RR do TplI- c_3 e Tpl- c_3 nos estados totalmente oxidado e totalmente reduzido.

Modo	TplI- c_3		Tpl- c_3	
	Oxidado	Reduzido	Oxidado	Reduzido
Frequência (cm^{-1}) - ν_4	1374	1358	1373	1358
Frequência (cm^{-1}) - ν_3	1504	1492	1504	1491
Frequência (cm^{-1}) - ν_2	1589	1591	1588	1591

2.3.2 Medidas de Espectroscopia de Ressonância de Raman Aumentada pela Superfície (SERRS)

As medidas espectroscópicas de Ressonância de Raman Aumentada pela Superfície (SERRS) foram realizadas a diferentes potenciais aplicados (de 0 a -0,6 V vs Ag/AgCl) para o TplI-c₃ adsorvido a eléctrodos de prata revestidos com a SAM de maltose e a SAM de ácido. Experiências semelhantes foram efectuadas com o TplI-c₃.

Os espectros de SERRS de ambos os citocromos c₃ apresentaram bandas a frequências características de ião ferro em hemo do tipo c hexacoordenado de spin baixo. Estas bandas ocorreram a frequências semelhantes às determinadas nos espectros de RR das respectivas proteínas em solução.

A análise dos espectros foi centrada na linha ν_4 (uma vez que esta é a linha marcadora do estado de oxidação) e verificou-se que em ambos os conjuntos de espectros correspondentes às duas SAM, as contribuições dos estados oxidado e reduzido encontram-se em diferentes proporções dependendo do potencial aplicado ao eléctrodo, como ilustra a figura 2.4.

Na SAM de C₁₁-maltose a proteína encontra-se no estado totalmente oxidado (1375 cm⁻¹ - ν_4) a 0,0 V e mantém-se no estado predominantemente oxidado até -0,375 V. A partir deste potencial o estado reduzido (1358 cm⁻¹ - ν_4) torna-se maioritário e ao potencial de -0,5 V a proteína encontra-se no estado totalmente reduzido (figura 2.4 a). Na SAM de C₁₁-ácido o TplI-c₃ está no estado totalmente oxidado a 1374 cm⁻¹ a 0,0 V, e maioritariamente no estado oxidado até -0,375 V, a partir do qual o estado reduzido a 1358 cm⁻¹ torna-se predominante e a proteína está no estado totalmente reduzido a -0,5 V (figura 2.4 b).

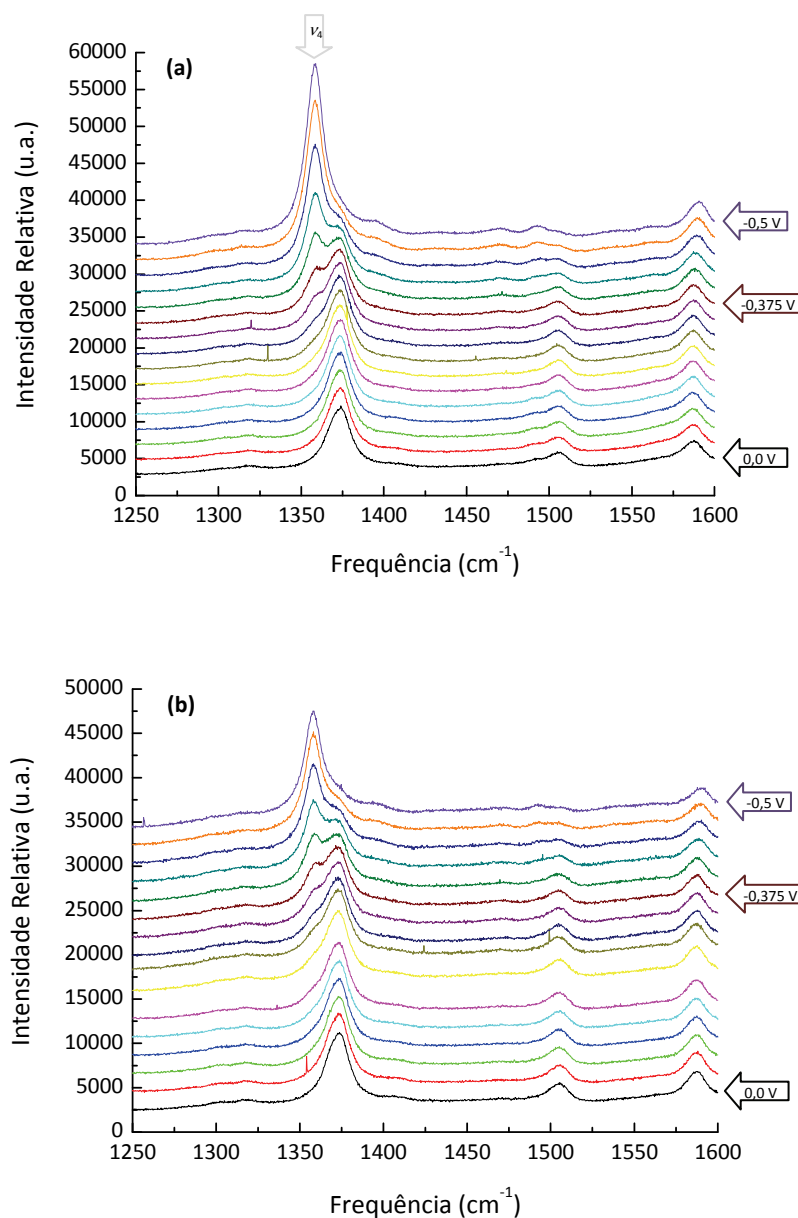


Figura 2.4 (a) Espectros de SERRS do TplI- c_3 adsorvido na SAM de C_{11} -maltose que reveste o eléctrodo de prata a potenciais aplicados de 0,0 V a -0,5 V **(b)** Espectros de SERRS do TplI- c_3 adsorvido na SAM de C_{11} -ácido que reveste o eléctrodo de prata aos potenciais aplicados de 0,0 V a -0,5 V. (Ambos os conjuntos de espectros foram obtidos nas mesmas condições experimentais de modo a permitir comparações).

Os espectros do TplI- c_3 adsorvidos ao eléctrodo de prata revestido com a SAM de maltose e a SAM de ácido mostraram que o sinal de SERRS é mais intenso na SAM de

maltose comparativamente com a SAM de ácido. Obtiveram-se resultados semelhantes para Tpl-C₃.

As medidas de SERRS também foram efectuadas no TplI-C₃ e Tpl-C₃ com adsorção directa à superfície do eléctrodo de prata na ausência de SAM de ácido ou de maltose. Os resultados não são apresentados uma vez que não foram reprodutíveis, provavelmente devido a ocorrerem problemas de desnaturação da proteína, pela interacção directa da mesma com o metal, o que não ocorreu na presença das SAM.

2.3.3 Análise de desconvolução dos espectros de RR e SERRS

A análise dos espectros de RR e SERRS (a cada potencial aplicado ao eléctrodo de prata) das proteínas foi realizada pela desconvolução dos espectros em bandas Lorentzianas, sendo focada nas intensidades relativas do ν_4 (a linha marcadora do estado de oxidação) e tendo como base as bandas anteriormente obtidas para os estados completamente oxidado e completamente reduzido.

Os resultados obtidos pela desconvolução dos espectros de RR e SERRS são apresentados na tabela 2.2.

Em solução (RR) a linha ν_4 para ambas as proteínas pode ser decomposta em duas espécies oxidadas e uma espécie reduzida.

Em SERRS, para o TplI-C₃ adsorvido nas duas monocamadas a linha ν_4 pode ser ajustada a duas espécies oxidadas e uma espécie reduzida, e para o Tpl-C₃ em SAM de maltose a linha ν_4 pode ser ajustada a uma espécie oxidada e duas espécies reduzidas, enquanto que para a SAM de ácido se obtêm duas espécies oxidadas e duas espécies reduzidas, tal como apresentado por Rivas e colaboradores para esta última proteína [11].

Tabela 2.2 Parâmetros espectrais do TplI- c_3 e TplI- c_3 oxidado e reduzido, imobilizado na SAM de maltose e na SAM de ácido que reveste o eléctrodo de prata e em solução, após desconvolução dos espectros em bandas Lorentzianas.

Proteína	Modo	SAM de C_{11} -maltose		SAM de C_{11} -ácido		Solução	
		Oxidado	Reduzido	Oxidado	Reduzido	Oxidado	Reduzido
TplI- c_3	Frequência (cm^{-1}) ν_4	1375	1358	1374	1358	1374	1358
		1368		1368		1369	
TplI- c_3	Frequência (cm^{-1}) ν_4	1372	1366	1375	1364	1373	1358
			1357	1369	1358	1369	

Como exemplo a figura 2.5 reproduz o ajuste das diferentes intensidades relativas das três espécies no espectro de SERRS do TplI- c_3 adsorvido na SAM de C_{11} -maltose para um potencial redox aplicado ao eléctrodo de -0,40 V, ao qual ambas as espécies (oxidada e reduzida) estão presentes.

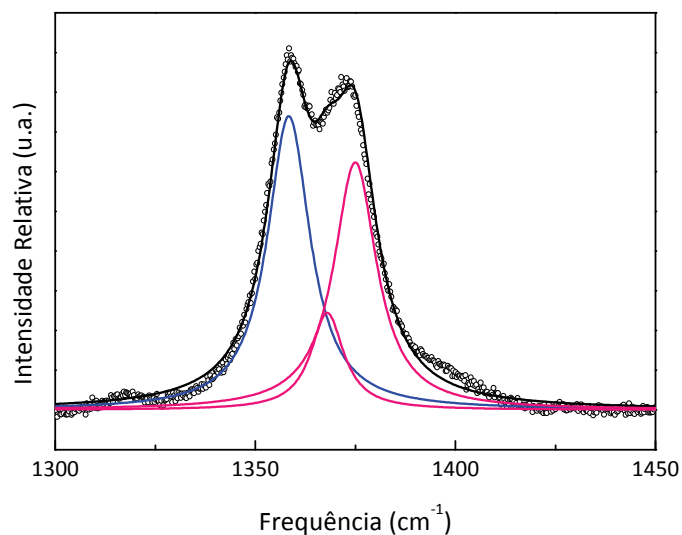


Figura 2.5 Espectro de SERRS (linhas ν_4) do TplI- c_3 adsorvido na SAM de C_{11} -maltose que reveste o eléctrodo de prata ao potencial aplicado ao eléctrodo de -0,40 V. Os círculos representam os pontos experimentais e a linha preta contínua resulta da soma do ajuste em linhas Lorentzianas dos componentes individuais do espectro: as linhas cor-de-rosa correspondem às duas espécies oxidadas (1368 e 1375 cm^{-1}) e a linha azul corresponde à espécie reduzida (1358 cm^{-1}).

Para a análise quantitativa dos espectros de SERRS [14] de ambas as proteínas, as áreas das bandas correspondentes às espécies oxidadas e reduzidas foram convertidas em concentrações relativas em função do potencial aplicado ao eléctrodo de prata, assumindo que os quatro hemos contribuem de igual modo para o espectro, como ilustra a figura 2.6.

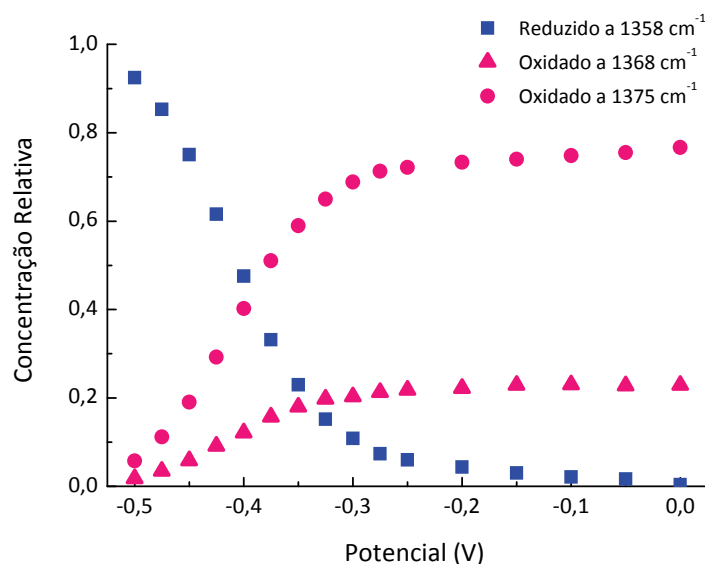


Figura 2.6 Concentrações relativas das três espécies envolvidas na análise do espectro de TplI-c₃ adsorvido na SAM de C₁₁-maltose que reveste o eléctrodo de prata, em função de cada potencial aplicado ao eléctrodo: estado oxidado a 1368 cm⁻¹ [Áreas espécie oxidada / $\sum$ (Áreas das duas espécies oxidadas + Áreas espécie reduzida)], estado oxidado a 1375 cm⁻¹ e estado reduzido a 1358 cm⁻¹ [Áreas espécie reduzida / $\sum$ (Áreas das duas espécies oxidadas + Áreas espécie reduzida)].

2.3.4 Determinação dos potenciais de redução

Os potenciais de redução para os quatro hemos de cada citocromo c₃ nas duas diferentes monocamadas, foram calculados pela razão da concentração [Reduzido] / [Oxidado] determinada para cada potencial, em que a [espécie reduzida] = $\sum$ (Áreas espécies reduzidas) / $\sum$ (Áreas espécies oxidadas + reduzidas), e a [espécie oxidada] = $\sum$ (Áreas espécies oxidadas) / $\sum$ (Áreas espécies oxidadas + reduzidas).

Estes dados foram ajustados à curva de Nernst (equação 1), no utilitário Origin 6.0, como ilustra a figura 2.7, assumindo que os hemos se encontram em equilíbrio 1:1 entre o estado oxidado e o reduzido, como previamente descrito para o Tpl- c_3 [10, 11].

A atribuição dos potenciais de redução aos hemos I, II, III e IV¹ foi efectuada de acordo com a simulação dinâmica molecular descrita por Rivas e colaboradores [11].

$$\frac{[Red]}{[Ox]} = \frac{\sum_{i=1}^4 \frac{k_i}{1 + k_i}}{\sum_{i=1}^4 \frac{1}{1 + k_i}} \quad (1)$$

sendo

$$k_i = \exp \left[-\frac{F}{RT} (E - E_i) \right]$$

E_i é o potencial de redução correspondente ao hemo, E é o potencial do eléctrodo, F a constante de Faraday, R a constante de gases perfeitos e T a temperatura absoluta.

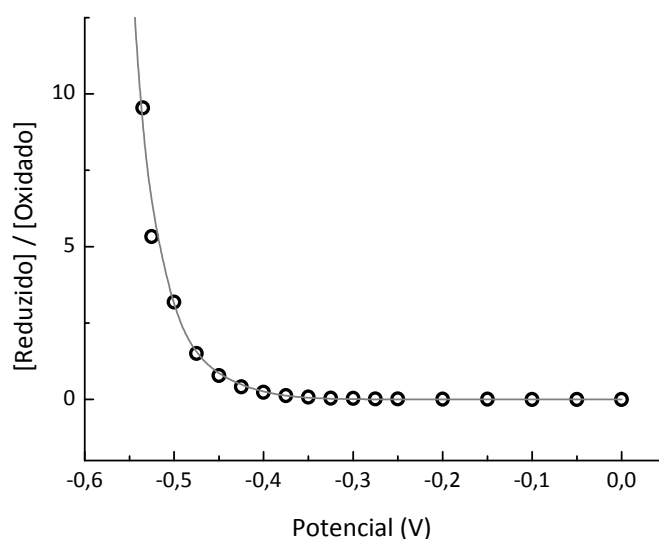


Figura 2.7 Razão da concentração [Reduzido] / [Oxidado] do TplII- c_3 imobilizado na SAM de C_{11} -maltose que reveste o eléctrodo de prata em função do potencial aplicado ao eléctrodo. Os círculos representam os dados experimentais e a linha representa o melhor ajuste obtido a partir da equação de Nernst.

¹ A autora agradece ao Doutor Roberto Di Paolo a determinação dos potenciais de redução.

Este procedimento permitiu determinar os potenciais de redução para os quatro hemos em ambas as superfícies e citocromos, como apresentado nas tabelas 2.3 e 2.4 e ilustrado nas figuras 2.8 e 2.9.

Tabela 2.3 Potenciais de redução em volt (referem-se ao eléctrodo normal de hidrogénio, ENH) do TplI-c₃ adsorvido às SAM que revestem os eléctrodos de prata e em solução.

TplI-c ₃	SAM de C ₁₁ -maltose	SAM de C ₁₁ -ácido	Titulação redox por UV-vis do TplI-c ₃ em solução [8]
Hemo I	-0,20 ± 0,03	-0,19 ± 0,01	-0,17
Hemo II	-0,24 ± 0,01	-0,26 ± 0,02	-0,24
Hemo III	-0,29 ± 0,01	-0,27 ± 0,02	-0,26
Hemo IV	-0,31 ± 0,02	-0,40 ± 0,01	-0,33

Tabela 2.4 Potenciais de redução em volt (referem-se ao eléctrodo normal de hidrogénio, ENH) do TplI-c₃ adsorvido às SAM que revestem os eléctrodos de prata e em solução.

TplI-c ₃	SAM de C ₁₁ -maltose	SAM de C ₁₁ -ácido	Titulação redox por RMN do TplI-c ₃ em solução [23]
Hemo I	-0,15 ± 0,01	-0,23 ± 0,02	-0,35
Hemo II	-0,25 ± 0,02	-0,31 ± 0,02	-0,31
Hemo III	-0,28 ± 0,03	-0,33 ± 0,01	-0,30
Hemo IV	-0,30 ± 0,02	-0,43 ± 0,02	-0,25

Para o TplI-c₃ verifica-se que os valores de potencial de redução para os hemos I, II e III nas SAM de C₁₁-maltose e de C₁₁-ácido são semelhantes entre si, e são semelhantes, dentro do erro, aos valores obtidos em solução pela titulação redox por UV-vis da proteína [8]. O potencial de redução do hemo IV é para a SAM de C₁₁-maltose semelhante, dentro do erro, ao valor de potencial obtido pela titulação redox, mas para a SAM de C₁₁-ácido o

potencial de redução difere em cerca de 20% do potencial descrito na literatura [8], como ilustra a figura 2.8.

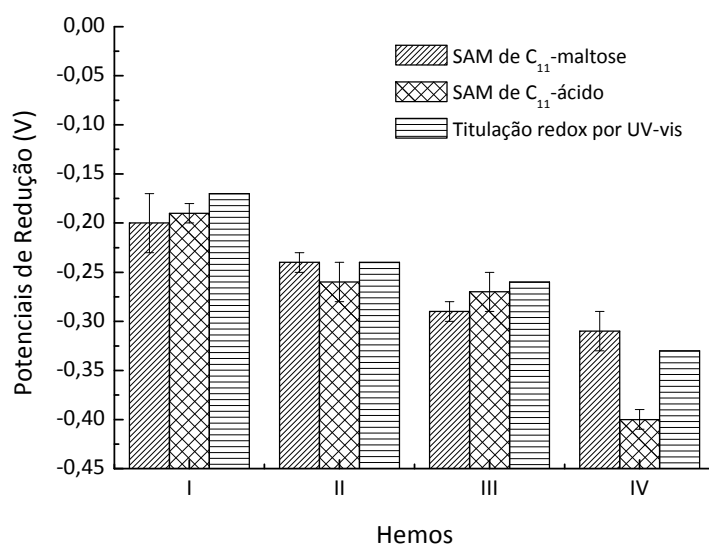


Figura 2.8 Potenciais de redução do TplI- c_3 para os quatro hemos da SAM de C_{11} -maltose, SAM de C_{11} -ácido e titulação redox por UV-vis do TplI- c_3 em solução.

Para o TplI- c_3 na SAM de maltose os potenciais de redução nos hemos II, III e IV são próximos, dentro do erro, aos obtidos em solução pela titulação redox por RMN [23]. O potencial de redução no hemo I difere em cerca de 60% do potencial de redução apresentado na literatura.

A SAM de ácido apresenta potenciais de redução nos hemos II e III semelhantes, dentro do erro, aos obtidos em solução por RMN e apresenta no hemo I e hemo IV potenciais de redução que diferem em cerca de 30% e 70%, respectivamente, dos potenciais de redução obtidos pela titulação redox por RMN da proteína em solução (figura 2.9).

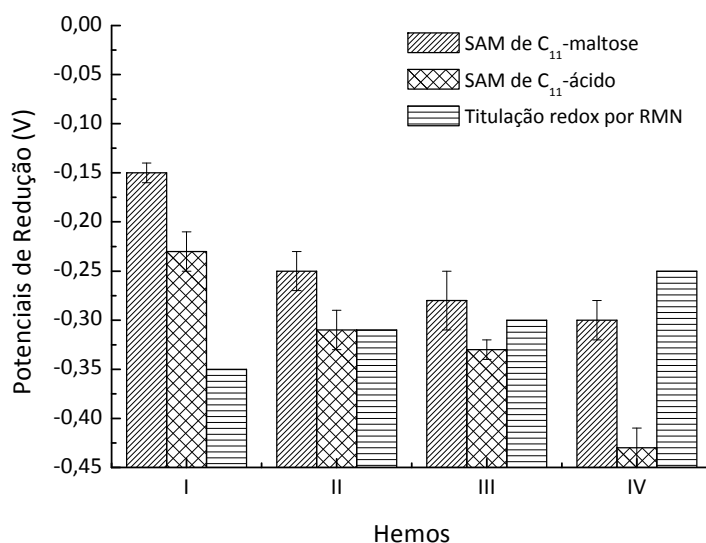


Figura 2.9 Potenciais de redução do Tpl- c_3 para os quatro hemos da SAM de C₁₁-maltose, SAM de C₁₁-ácido e titulação redox por RMN do Tpl- c_3 em solução.

Comparando as duas proteínas, os valores de potencial de redução para os quatro hemos revelaram ser semelhantes para a mesma SAM (figuras 2.8 e 2.9).

Foram observadas diferenças no comportamento do TplII- c_3 e Tpl- c_3 adsorvido na SAM de maltose e na SAM de ácido em diferentes estados redox da proteína (no estado totalmente oxidado: 0,0 V e no estado totalmente reduzido: -0,5 V), como ilustrado na figura 2.10 e apresentado na tabela 2.5. Os espectros para os dois estados de oxidação extremos foram obtidos para a mesma amostra, garantindo-se assim a possibilidade de comparação de intensidades dos respectivos espectros para ambos os estados de oxidação.

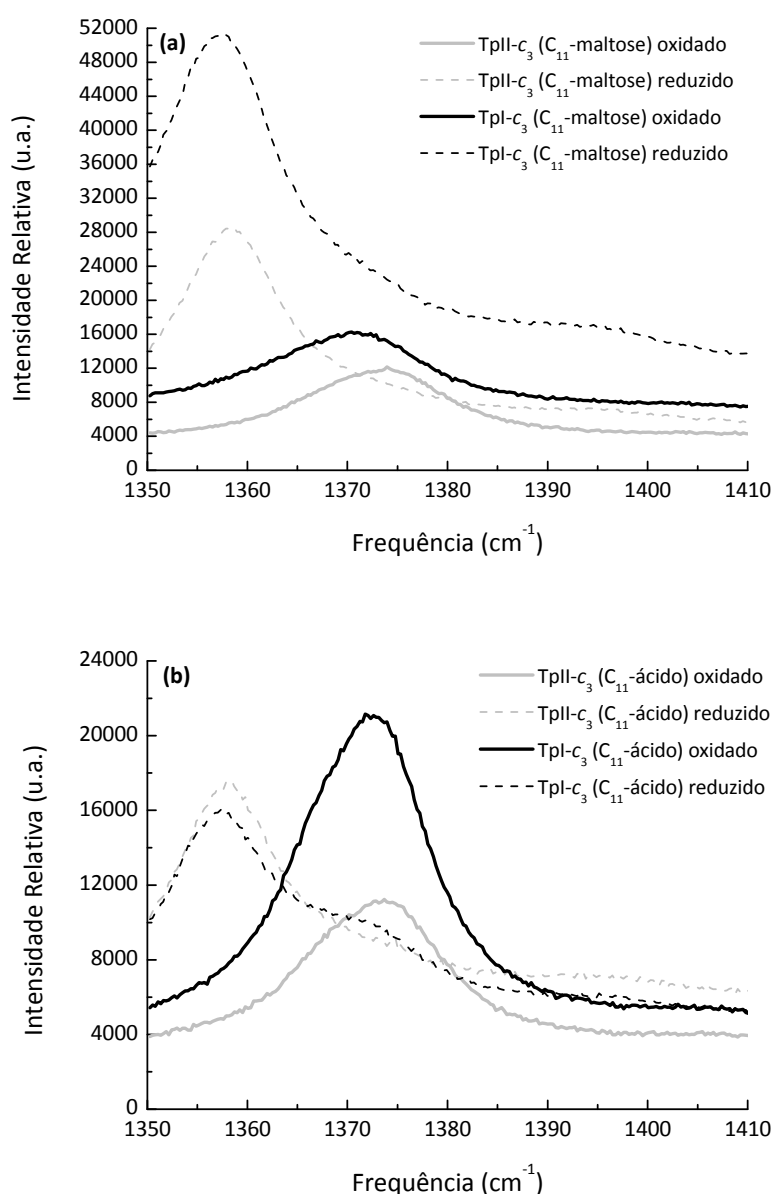


Figura 2.10 (a) Espectros de SERRS (linhas ν_4) do TplI- c_3 (linha cinzenta) e Tpl- c_3 (linha preta) adsorvidos na SAM de C_{11} -maltose ao potencial aplicado ao eléctrodo de 0,0 V (linhas sólidas) e -0,5 V (linhas tracejadas) e **(b)** Espectros de SERRS (linhas ν_4) do TplI- c_3 (linha cinzenta) e Tpl- c_3 (linha preta) adsorvidos na SAM de C_{11} -ácido ao potencial aplicado ao eléctrodo de 0,0 V (linhas sólidas) e -0,5 V (linhas tracejadas).

Tabela 2.5 Intensidade relativa máxima da espécie oxidada e reduzida e respectiva razão, para o TplI-c₃ e Tpl-c₃ adsorvidos na SAM de C₁₁-maltose e na SAM de C₁₁-ácido.

Proteína	SAM de C ₁₁ -maltose			SAM de C ₁₁ -ácido		
	Intensidade máxima para a espécie oxidada (u.a.)	Intensidade máxima para a espécie reduzida (u.a.)	Espécie reduzida / Espécie oxidada	Intensidade máxima para a espécie oxidada (u.a.)	Intensidade máxima para a espécie reduzida (u.a.)	Espécie reduzida / Espécie oxidada
TplI-c ₃	12147	28437	2,3	11150	17543	1,6
Tpl-c ₃	16265	51359	3,2	21157	15872	0,75

Pela análise da tabela verifica-se que a razão da intensidade relativa máxima (espécie reduzida/espécie oxidada) é para ambos os citocromos c₃ mais elevada na SAM de maltose, comparativamente com a SAM de ácido. Na SAM de maltose a razão é maior no Tpl-c₃ em relação ao TplI-c₃ enquanto que na SAM de ácido se verifica o oposto.

O TplI-c₃ apresenta na SAM de maltose uma razão da intensidade relativa máxima (espécie reduzida/espécie oxidada) que é ligeiramente superior à da SAM de ácido, enquanto que o Tpl-c₃ apresenta uma razão na SAM de maltose cerca de quatro vezes superior à da SAM de ácido.

2.4 Discussão de Resultados

No presente capítulo foi confirmada pelas medidas de SERRS a interação entre cada citocromo c₃ e as SAM de ácido ou de maltose que recobrem o eléctrodo de prata, e determinados os potenciais de redução para os quatro hemos.

A semelhança das frequências características do hemo do tipo c na coordenação hexacoordenada de spin baixo entre os espectros de SERRS e os espectros de RR de ambas as proteínas, parecem indicar que a imobilização das proteínas não causa alterações estruturais apreciáveis dos sítios de redução.

Os potenciais de redução determinados para os hemos individuais do TplI-c₃ em ambas as SAM foram semelhantes aos potenciais de redução obtidos em solução pela

titulação por UV-vis [8], com excepção do potencial de redução do hemo IV na SAM de ácido que mostrou uma diferença de cerca de 20% quando comparado com o potencial de redução da SAM de maltose ou com a titulação redox por UV-vis da proteína em solução.

Contrariamente, os potenciais de redução determinados para os quatro hemos do Tpl- c_3 em SAM de maltose e em SAM de ácido, apresentaram diferenças significativas comparativamente com os potenciais de redução obtidos em solução pela titulação por RMN da proteína. As diferenças foram observadas na SAM de maltose em que o potencial de redução no hemo I apresentou uma diferença em cerca de 60% do potencial de redução descrito na literatura [23], e na SAM de ácido em que o hemo I e hemo IV apresentaram potenciais de redução com uma diferença em cerca de 30% e 70%, respectivamente, dos potenciais de redução obtidos pela titulação redox por RMN da proteína em solução.

Verificaram-se diferenças significativas no comportamento do TplII- c_3 e Tpl- c_3 em SAM de ácido ou de maltose no estado totalmente reduzido e totalmente oxidado.

O facto da razão da intensidade relativa máxima (espécie reduzida/espécie oxidada) na SAM de maltose ser superior à SAM de ácido para ambos os citocromos, pode estar relacionado com a adsorção diferencial de massa nas monocamadas dos diferentes estados redox da proteína. Tal efeito foi observado para o Tpl- c_3 imobilizado num eléctrodo de ouro modificado com um dador electrónico (metilviologénio), em que medidas simultâneas de amperometria e acumulação de massa (medida com balança de cristal de quartzo) permitiram concluir que o estado reduzido da proteína apresenta um efeito de acumulação de massa e electrões [24].

A maior apetência de ambos os citocromos no estado reduzido para a SAM de maltose relativamente à SAM de ácido pode estar relacionada com o modo de adsorção da proteína à SAM de maltose que reveste o eléctrodo de prata. Este modo de adsorção será possivelmente através de pontes de hidrogénio entre os grupos OH da maltose (açúcar) e as cadeias laterais polares da proteína, possivelmente mediada por moléculas de água [19].

A existência de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo na maltose foi proposta por Yates e colaboradores [25], confirmando que este açúcar forma uma rede de ligações por pontes de hidrogénio de estrutura não disruptiva e compete com o solvente aquoso para a interacção directa com as cadeias laterais da estrutura da proteína.

Para testar a hipótese de outras SAM com grupos OH poderem também ser eficazes, o TplII- c_3 foi adsorvido a 11-mercaptoundecanol ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$), grau de pureza de

97%, Sigma-Aldrich,) que reveste os eléctrodos de prata, nas mesmas condições experimentais.

Foi observado um sinal de SERRS muito pouco intenso (o que mostra que a quantidade de proteína ligada foi muito pequena) comparativamente com os sinais intensos de SERRS obtidos para a proteína adsorvida na SAM de C₁₁-maltose, o que é concordante com o anteriormente publicado por Murgida e Hildebrandt, em que não foram detectados quaisquer sinais de SERRS no citocromo *c* de coração de cavalo adsorvido a eléctrodos de prata revestidos com 11-mercaptoundecanol [14]. Este resultado mostra que a estrutura do ligando de maltose é essencial para a formação de uma ligação por pontes de hidrogénio estável, permitindo a adsorção e a transferência electrónica entre a proteína e o eléctrodo.

2.5 Conclusões

Este estudo demonstrou que a SAM de C₁₁-maltose é uma superfície favorável para a espectroelectroquímica das proteínas tetra-hémicas estudadas, e permitiu a determinação dos potenciais de redução individuais para os quatro hemos.

Embora a SAM de ácido seja extensivamente usada com sucesso em estudos de SERRS com o Tpl-c₃ e citocromo *c* de coração de cavalo, a SAM de maltose apresenta-se como uma superfície mais adequada para SERRS, uma vez que há uma maior intensidade do sinal de SERRS da proteína adsorvida na SAM de maltose comparativamente com a SAM de ácido. Tal efeito pode dever-se ao facto da interacção entre a SAM de maltose e a proteína ocorrer possivelmente via ligação por pontes de hidrogénio formando uma rede não disruptiva e independente do pH, contrariamente à interacção entre a proteína e a SAM de ácido, que ocorre por via electrostática.

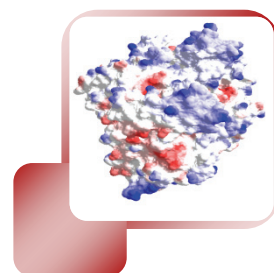
Em conclusão, a SAM de maltose constitui uma superfície promissora e adequada para a espectroelectroquímica das proteínas hémicas analisadas.

2.6 Bibliografia

- [1] Hildebrandt, P.; Stockburger, M. *Biochemistry* **1989**, 28, 6710-6721.
- [2] Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4062-4068.
- [3] Bonifacio, A.; Millo, D.; Keizers, P. H. J.; Boegschoten, R.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E.; Gooijer, C.; Zwan, G. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, 13, 85-96.
- [4] Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 854-861.
- [5] Hildebrandt, P.; Murgida, D. H. *Bioelectrochemistry* **2002**, 55, 139-143.
- [6] Paquete, C. M.; Turner, D. L.; Louro, R. O.; Xavier, A. V.; Catarino, T. *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, 1767, 1169-1179.
- [7] Simaan, A. J.; Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. *Biopolymers* **2002**, 67, 331-334.
- [8] Valente, F. M. A.; Saraiva, L. M.; LeGall, J.; Xavier, A. V.; Teixeira, M.; Pereira, I. A. C. *ChemBioChem* **2001**, 2, 895-905.
- [9] Di Paolo, R. E.; Pereira, P. M.; Gomes, I.; Valente, F. M.; Pereira, I. A.; Franco, R. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 217-224.
- [10] Di Paolo, R. E.; Rivas, L.; Murgida, D.; Hildebrandt, P. *Phys. Scr.* **2005**, T118, 225-227.
- [11] Rivas, L.; Soares, C. M.; Baptista, A. M.; Simaan, J.; Di Paolo, R. E.; Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. *Biophys. J.* **2005**, 88, 4188-4199.
- [12] Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernandez, A.; Penadés, S. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 1909-1921.
- [13] Hobara, D.; Niki, K.; Cotton, T. M. *Biospectroscopy* **1998**, 4, 161-170.
- [14] Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. *J. Phys. Chem B* **2001**, 105, 1578-1586.
- [15] Hernáiz, M. J.; de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1554-1557.
- [16] Rojo, J.; Díaz, V.; de la Fuente, J. M.; Segura, I.; Barrientos, A. G.; Riese, H. H.; Bernad, A.; Penadés, S. *ChemBioChem* **2004**, 5, 291-297.
- [17] Tromas, C.; Eaton, P.; Mimault, J.; Rojo, J.; Penadés, S. *Langmuir* **2005**, 21, 6142-6144.
- [18] Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *Science* **1991**, 252, 1164-1167.
- [19] Sears, P.; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2301-2324.
- [20] Gomes, I.; Di Paolo, R. E.; Pereira, P. M.; Pereira, I. A. C.; Saraiva, L. M.; Penadés, S.; Franco, R. *Langmuir* **2006**, 22, 9809-9811.
- [21] Turner, D. L.; Salgueiro, C. A.; LeGall, J.; Xavier, A. V. *Eur. J. Biochem.* **1992**, 210, 931-936.

- [22] Spiro, T. G.; Strekas, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 338-345.
- [23] Turner, D. L.; Salgueiro, C. A.; Catarino, T.; LeGall, J.; Xavier, A. V. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 241, 723-731.
- [24] Asakura, N.; Kamachi, T.; Okura, I. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 1007-1016.
- [25] Yates, J. R.; Pham, T. N.; Pickard, C. J.; Mauri, F.; Amado, A. M.; Gil, A. M.; Brown, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10216-10220.

CAPÍTULO 3. IMOBILIZAÇÃO DA FERROQUELATASE EM MONOCAMADAS AUTO-MONTADAS À SUPERFÍCIE DE OURO



3.1 Introdução

No presente capítulo é estudada a imobilização da ferroquelatase recombinante de fígado de rato em monocamadas auto-montadas (SAM) de alcanotióis à superfície de ouro por microscopia de força atômica (AFM), com vista à formação de um biossensor.

Este trabalho foi desenvolvido tendo como base a investigação levada a cabo por Rotello e colaboradores, ao nível da adsorção de proteínas a agentes de revestimento tiolados que recobrem a superfície de nanopartículas [1].

A ferroquelatase (ferro-liase do protohemo, EC 4.99.1.1) é uma enzima que actua no último passo da via biossintética do hemo, catalizando a inserção do átomo de ferro (Fe^{2+}) na protoporfirina IX para dar origem ao protohemo IX (hemo), como ilustra a figura 3.1 [2-6].

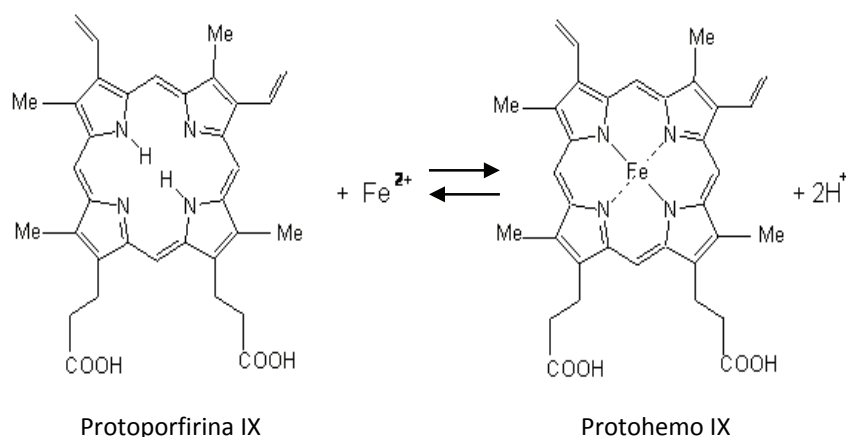


Figura 3.1 Reacção catalisada pela ferroquelatase (adaptado da referência [6]).

In vitro, a enzima pode também quelar outros iões metálicos divalentes, como por exemplo: Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} [2]. A enzima está ancorada à membrana mitocondrial interna nos eucariotas com o centro activo virado para o interior da matriz mitocondrial e também pode estar associada à membrana citoplasmática dos procariotas [6]. A ferroquelatase é funcional como um dímero no ambiente membranar e contém um centro de ferro-enxofre [2Fe-2S] [3, 7]. O centro encontra-se presente nas ferroquelatases de fígado de rato e humana, contrastando com a ferroquelatase de levedura, bactérias e plantas, em que está ausente [7].

Esta enzima tem um importante papel na saúde humana, no que respeita o metabolismo do ferro no corpo. Perturbações da biossíntese do hemo causadas pela diminuição da actividade da ferroquelatase e consequente acumulação de protoporfirina na pele e no fígado, conduzem a uma doença designada por porfiria eritropoiética, que se manifesta principalmente por dermatites sensíveis à luz e insuficiência hepática [3, 4].

Neste estudo, imobilizou-se ferroquelatase recombinante de fígado de rato em SAM de alcanotióis com diferentes funcionalidades, com vista à obtenção de uma superfície com propriedades catalíticas.

As SAM são muito versáteis, podendo apresentar uma diversidade de funcionalidades e características químicas favoráveis à imobilização das enzimas à superfície do ouro. A simplicidade do método de preparação, estabilidade, retenção das propriedades funcionais da superfície, controlo molecular e reprodutibilidade, permitem que sejam extensivamente usadas para estudos de adsorção de proteínas e enzimas [8]. Com vista à preservação da capacidade catalítica da enzima, são favorecidas SAM que gerem superfícies que liguem a enzima sem alterar apreciavelmente a sua estrutura tridimensional e activa. Assim, afiguram-se particularmente vantajosas SAM que liguem a proteína por interacções fracas e não disruptivas, como sejam interacções electrostáticas, por oposição a SAM às quais a ligação da proteína ocorre com base em modificações covalentes dos resíduos laterais da cadeia polipeptídica. Este tipo de ligação covalente é extensivamente utilizado na imobilização de proteínas em superfícies, mas leva na maioria dos casos à inactivação de uma elevada percentagem da proteína imobilizada.

As SAM estudadas foram obtidas com alcanotióis apresentando grupos terminais com diferentes características químicas (catiónicos, aniónicos e neutros-hidrofóbicos). Estes alcanotióis foram utilizados para formar SAM puras, contendo só um tipo de ligando; ou SAM mistas em que se misturam dois desses alcanotióis. A ferroquelatase adsorveu às SAM electrostaticamente ou por imobilização covalente. A imobilização covalente foi efectuada pela reacção da enzima com os grupos terminais de ácido carboxílico da SAM, através dos agentes de acoplamento EDC/NHS [cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisuccinimida], figura 3.2, e pela reacção da enzima com uma SAM de DSP (propionato de ditio-bis succinimidil), figura 3.3.

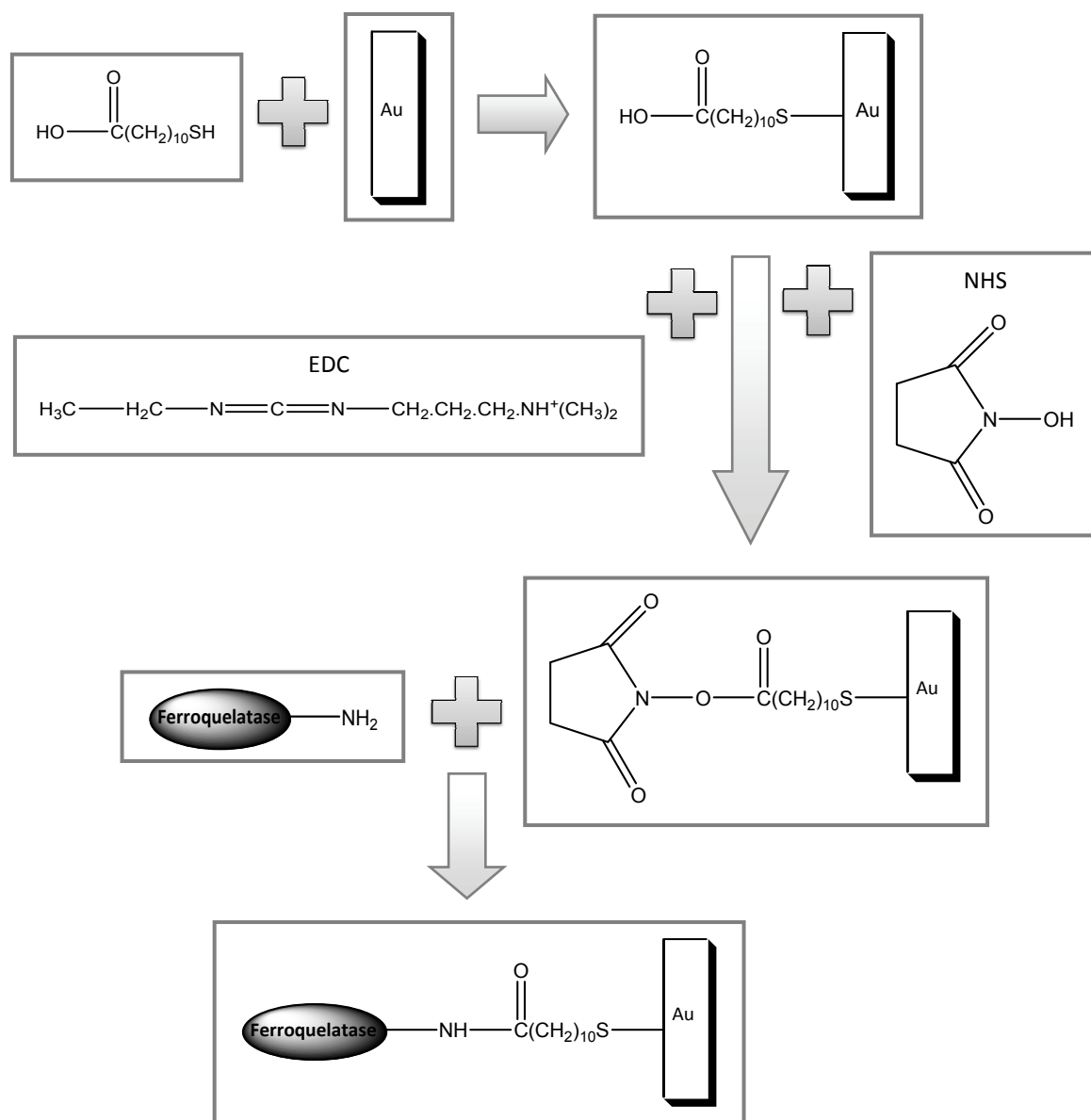


Figura 3.2 Representação esquemática da imobilização da ferroquelatase em SAM de COOH activada com EDC/NHS à superfície de ouro.

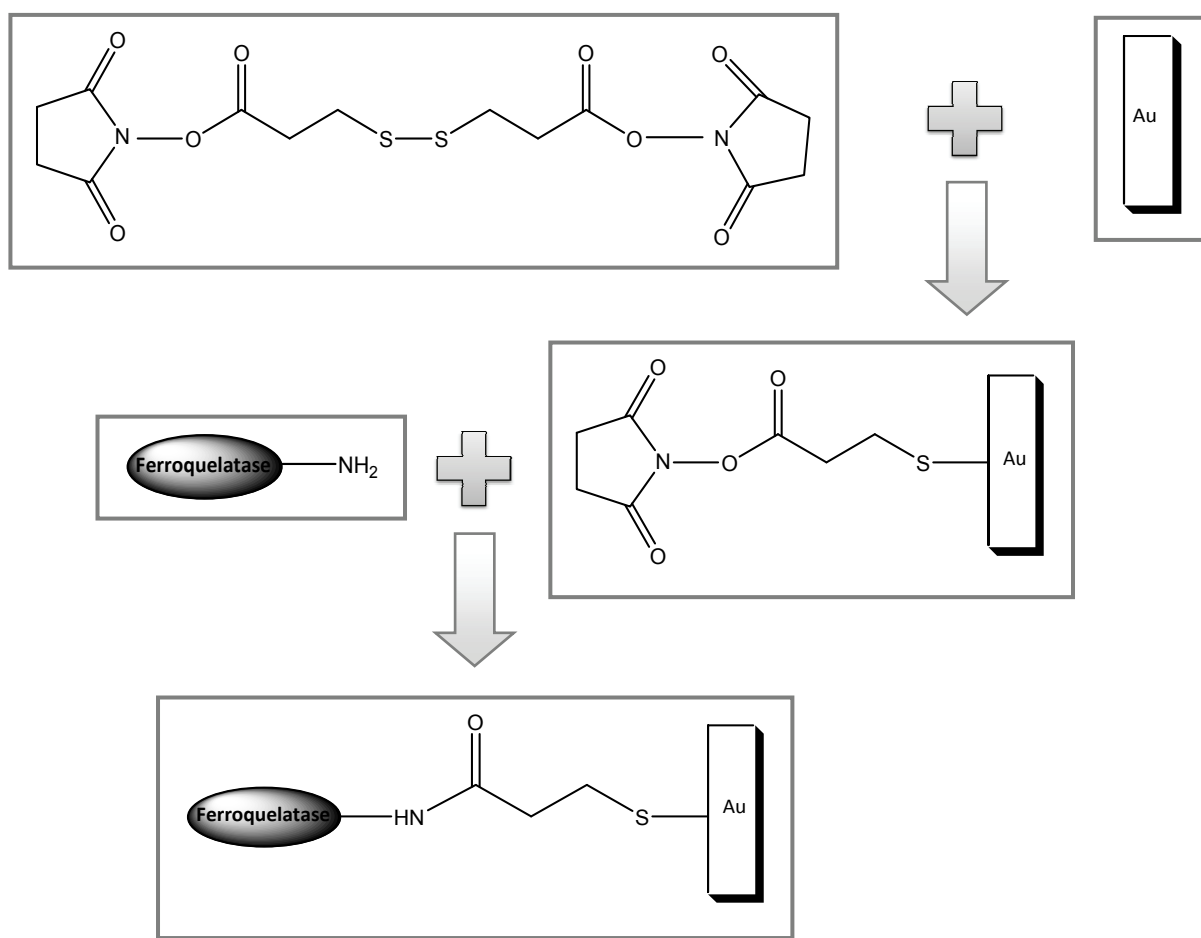


Figura 3.3 Representação esquemática da imobilização da ferroquelatase em SAM de DSP puro à superfície de ouro.

A imobilização da ferroquelatase nas SAM acima descritas à superfície de ouro foi demonstrada e caracterizada por microscopia de força atômica.

A AFM permite estudar a morfologia da superfície, visualizar proteínas adsorvidas nas superfícies de ouro modificadas com SAM, observar biomoléculas individuais e proporcionar informação acerca da interação proteína-superfície [9].

A proteína adsorveu em todas as monocamadas estudadas à superfície do ouro, preferencialmente na SAM pura hidrofóbica (100% CH_3) e na SAM mista aniônica/hidrofóbica (50% COO^- : 50% CH_3). Uma elevada adsorção da proteína foi observada nos casos de ligação covalente à SAM de COOH activada por EDC/NHS e SAM de DSP puro.

3.2 Procedimento Experimental

3.2.1 Preparação da ferroquelatase

O gene da ferroquelatase de fígado de rato foi clonado, sequenciado e expresso em *E. coli* [6] e sobre-expresso por Ferreira [10]. A autora inseriu o gene que codifica a ferroquelatase de fígado de rato num plasmídeo (pGF42) que foi transformado para células de *E. coli* DH5 α . Este plasmídeo ao crescer num meio de cultura com fosfato limitante induziu a sobre-expressão do gene da ferroquelatase que se encontra sob o controlo de um promotor de fosfatase alcalina [10].

Para a obtenção da ferroquelatase recombinante de fígado de rato procedeu-se ao seu isolamento e purificação a partir de culturas de células de *E. coli* contendo o plasmídeo (pGF42), nas quais a proteína se encontra clonada e em sobre-expressão (consultar apêndice III).

3.2.2 Preparação dos substratos de ouro para imobilização da ferroquelatase

O ouro evaporado em camada fina, de espessura 200 nm (Arrandee) foi imerso na solução “piranha” (3:1 H₂SO₄ concentrado / 30% H₂O₂) durante alguns minutos, enxaguado com etanol absoluto (grau de pureza de 99,8%, Riedel-de-Haën) e água ultra-pura (sistema de água Milli-Q, Millipore, 18,2 M Ω .cm), secado com azoto e aquecido com uma chama de gás (“flame-annealed”) para produzir uma superfície de ouro plana com uma orientação cristalográfica predominante (Au-111).

Os substratos de ouro foram incubados directamente na solução de cada um dos alcanotóis a 1mM, durante 12 horas à temperatura ambiente, enxaguados com etanol absoluto, água ultra-pura e secos com azoto.

Os alcanotóis usados para formar as diferentes superfícies das SAM foram seleccionados com base em diferentes grupos terminais, de modo a variar as propriedades (hidrofobicidade e carga) da superfície [8, 11, 12]. Os compostos puros e as misturas utilizadas na preparação das SAM formadas apresentam-se na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Monocamadas auto-montadas de alcanotióis formadas à superfície de ouro.

SAM	Designação dos Alcanotióis (obtidos comercialmente a partir da Sigma-Aldrich e Fluka)	Concentração
SAM puras		
Catiónica (terminação NH_3^+)	Cloridrato de 11-amino-1-undecanotiol $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$	1 mM em etanol absoluto
Neutra-Hidrofóbica (terminação CH_3)	1-Hexanotiol $\text{HS}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	
Aniónica (terminação COO^-)	Ácido 11-mercaptoundecanóico $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	
SAM mistas		
50% aniónica : 50% hidrofóbica	50% $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$: 50% $\text{HS}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	1 mM em etanol absoluto
80% aniónica : 20% hidrofóbica	80% $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$: 20% $\text{HS}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	
90% DSP (ligação covalente): 10% C_4SH (hidrofóbica)	90% DSP (propionato de ditio-bis succinimidil $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$) : 10% $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3 = \text{C}_4\text{SH}$ (butanotiol)	1 mM em acetona
Ligação covalente		
SAM de COOH activada com EDC/NHS	EDC [cloridrato de 1-etil-3-(3- dimetilaminopropil) carbodiimida $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\cdot\text{HCl}$] / NHS (N-hidroxisuccinimida $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$)	EDC a 50 mM e NHS a 10 mM em água ultra-pura
SAM de DSP puro	DSP ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$)	1 mM em acetona

Os substratos de ouro modificados com as SAM foram imersos na solução de ferroquelatase a 1 $\mu\text{g/mL}$ diluída no tampão Tris-HCl 20 mM, pH = 8 (inferior ao ponto isoeléctrico, pI da proteína = 8,87, determinado pelo programa “Compute pI/Mw” do portal ExPASy [13]), glicerol a 10% e NaCl a 150 mM, durante 30 min. a 4 °C; com excepção dos ensaios realizados com a SAM de NH_2 , em que a proteína foi diluída no mesmo tampão, mas a pH = 6,5 (para que o NH_2 esteja parcialmente protonado). Após o período de 30 min. os

substratos de ouro foram enxaguados com água, secos com azoto e observados por microscopia de força atómica.

Para a ligação covalente da proteína à SAM de COOH, os substratos de ouro modificados com a referida SAM foram imersos numa solução de EDC a 50 mM e solução de NHS a 10 mM durante 30 min. à temperatura ambiente, enxaguados com água e imersos na solução de ferroquelatase a 1 µg/mL.

A preparação dos substratos de ouro foi realizada no laboratório de SPM da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

3.2.3 Medidas de Microscopia de Força Atómica (AFM)

As medidas de AFM foram efectuadas num microscópio de força atómica, Multimode (Digital Instruments, Veeco), com um controlador Nanoscope IIIa, à temperatura ambiente e ao ar. O microscópio foi operado no modo intermitente (“tapping”) e foram usadas pontas de silício montadas em braços (“cantilevers”) rectangulares (TAP300, BudgetSensors), com uma frequência de ressonância típica de 300 kHz. As amostras foram varridas a velocidades entre 1,5 e 1,9 Hz e as imagens seleccionadas são representativas de um conjunto de medidas estáveis e reprodutíveis, a partir de três amostras de cada SAM preparadas e medidas nas mesmas condições experimentais mas em dias diferentes.

As imagens de AFM foram obtidas pela Doutora Ana Viana, no laboratório de SPM da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterização dos substratos de ouro por AFM

Efectuou-se uma caracterização prévia do substrato de ouro limpo, do substrato de ouro com as SAM à superfície e do substrato de ouro com a proteína imobilizada, como controlo para a caracterização da ferroquelatase imobilizada em SAM à superfície de ouro.

A imagem de AFM do substrato de ouro apresenta uma superfície plana de ouro atômico com a presença de terraços monoatômicos (figura 3.4 a). Na presença de uma monocamada obtida a partir do derivado $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ com aproximadamente 2 nm de altura, é possível verificar por AFM que o substrato de ouro modificado, embora ligeiramente mais rugoso, ainda apresenta terraços monoatômicos, tal como ilustra a figura 3.4 b. Em contrapartida, após a adsorção da proteína directamente no ouro (na ausência de SAM) não se observam as características do substrato, mas sim, estruturas globulares depositadas na superfície do ouro (figura 3.4 c).

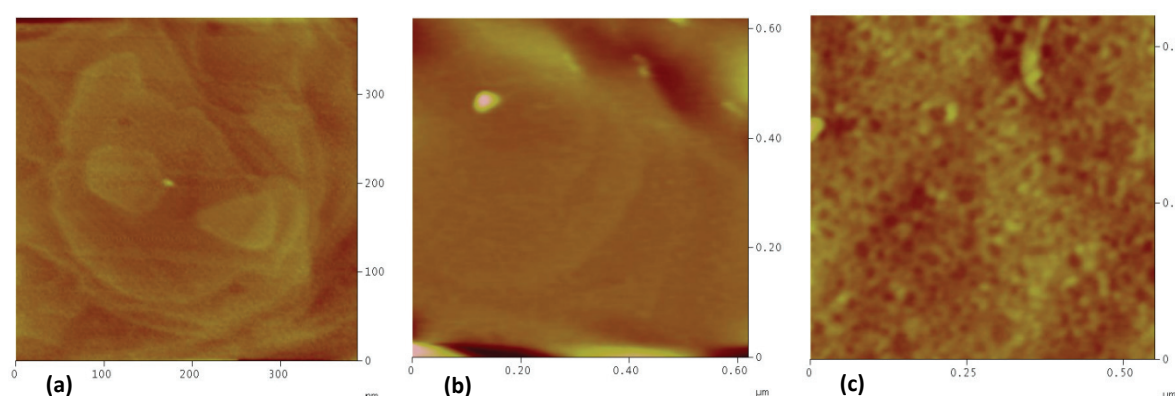


Figura 3.4 Imagens topográficas de AFM no modo intermitente **(a)** superfície de ouro **(b)** superfície de ouro recoberta com a SAM catiónica $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ e **(c)** superfície de ouro recoberta com a ferroquelatase.

3.3.2 Caracterização da ferroquelatase imobilizada em monocamadas auto-montadas à superfície de ouro por AFM

A imobilização da ferroquelatase em SAM puras, mistas e através de ligação covalente à SAM foi demonstrada e caracterizada por AFM.

3.3.2.1 Caracterização da ferroquelatase imobilizada em monocamadas auto-montadas puras à superfície de ouro

A ferroquelatase foi imobilizada em SAM puras, tais como: catiónica (terminação NH_3^+), aniónica (terminação COO^-) e neutra-hidrofóbica (terminação CH_3).

As imagens de AFM mostram que a ferroquelatase adsorveu nas três monocamadas estudadas, com diferenças na sua distribuição à superfície.

A proteína adsorve preferencialmente na SAM hidrofóbica (figura 3.5), comparativamente com a SAM catiónica (figura 3.6) e aniónica (figura 3.7).

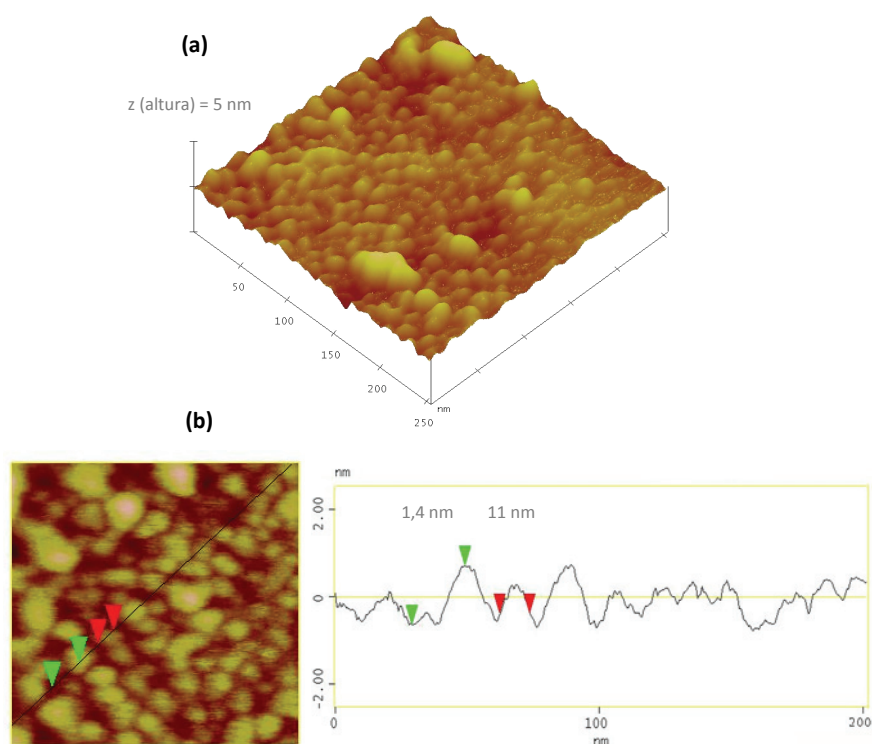


Figura 3.5 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM pura neutra-hidrofóbica $\text{HS}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ e (b) Análise de secção da proteína.

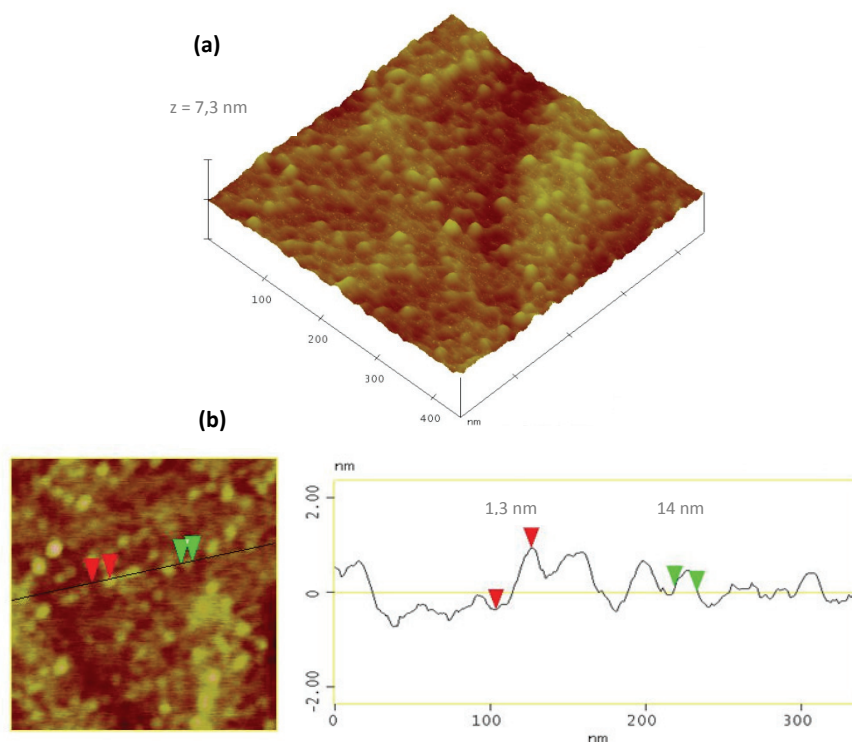


Figura 3.6 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM pura catiónica $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ e **(b)** Análise de secção da proteína.

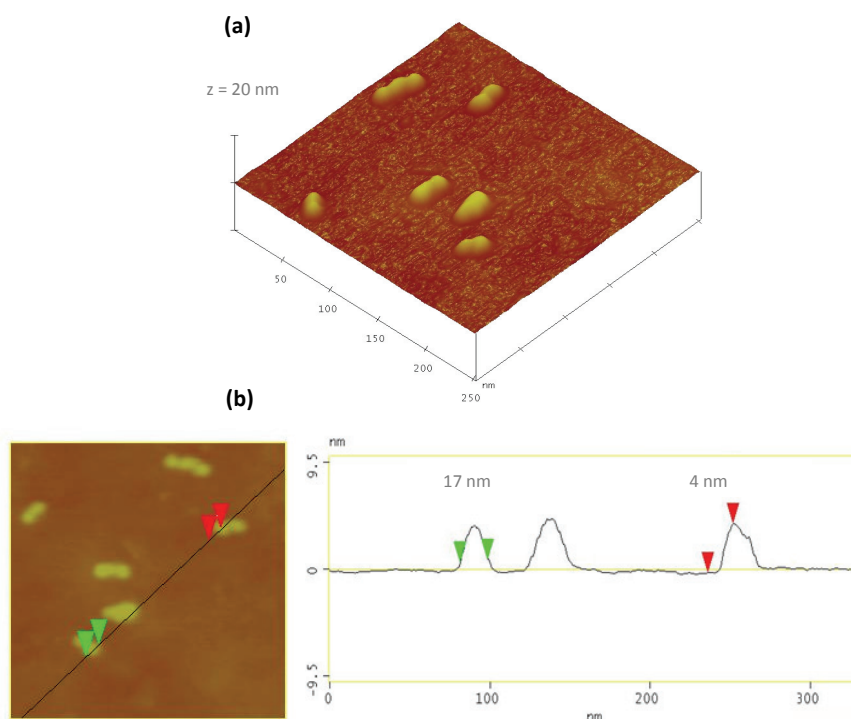


Figura 3.7 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM pura aniónica $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ e **(b)** Análise de secção da proteína.

As imagens de AFM apresentadas para a ferroquelatase imobilizada em cada uma das SAM puras são representativas de um conjunto de imagens obtidas a partir de três amostras preparadas e medidas nas mesmas condições experimentais mas em dias diferentes. Destas imagens pode concluir-se que ocorre uma maior adsorção da ferroquelatase na SAM pura hidrofóbica (terminação CH_3), seguindo-se a SAM pura catiónica (terminação NH_3^+) e por último observou-se uma menor adsorção da proteína na SAM pura aniónica (terminação COO^-).

A proteína apresenta-se maioritariamente na forma individualizada, embora também apareça na forma aglomerada. Esta última forma é muito visível na imagem topográfica tridimensional de AFM da SAM aniónica (figura 3.7 a), assim como na análise de secção da proteína (figura 3.7 b), em que a distância vertical (4 nm) é cerca do triplo da apresentada nas SAM catiónica (1,3 nm) e hidrofóbica (1,4 nm), e a distância horizontal ligeiramente superior.

3.3.2.2 Caracterização da ferroquelatase imobilizada em monocamadas auto-montadas mistas à superfície de ouro

As SAM mistas estudadas foram compostas por 50% COO^- : 50% CH_3 , 80% COO^- : 20% CH_3 e 90% DSP: 10% C_4SH .

As características globulares observadas na superfície das SAM confirmaram a presença da ferroquelatase.

A adsorção da proteína é maior na SAM mista contendo maior percentagem de alcanotiol hidrofóbico (50% COO^- : 50% CH_3), como ilustra a figura 3.8 em comparação com a SAM mista em que esta percentagem é menor (80% COO^- : 20% CH_3), figura 3.9, o que está de acordo com os resultados obtidos nas SAM puras, em que a maior adsorção da ferroquelatase ocorreu na SAM hidrofóbica (100% CH_3).

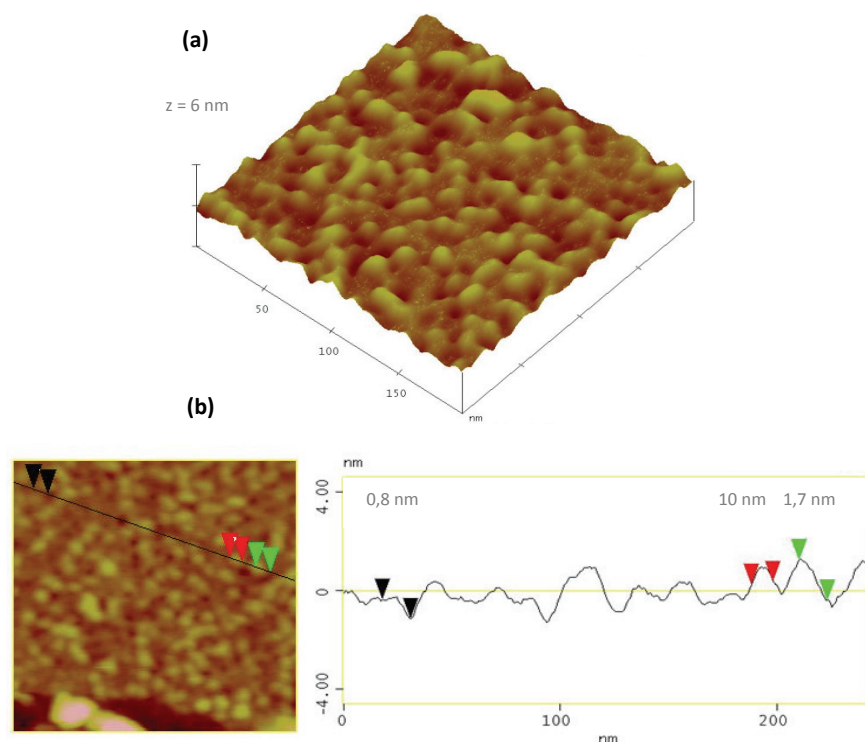


Figura 3.8 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM mista 50% $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$: 50% $\text{HS}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ e **(b)** Análise de secção da proteína.

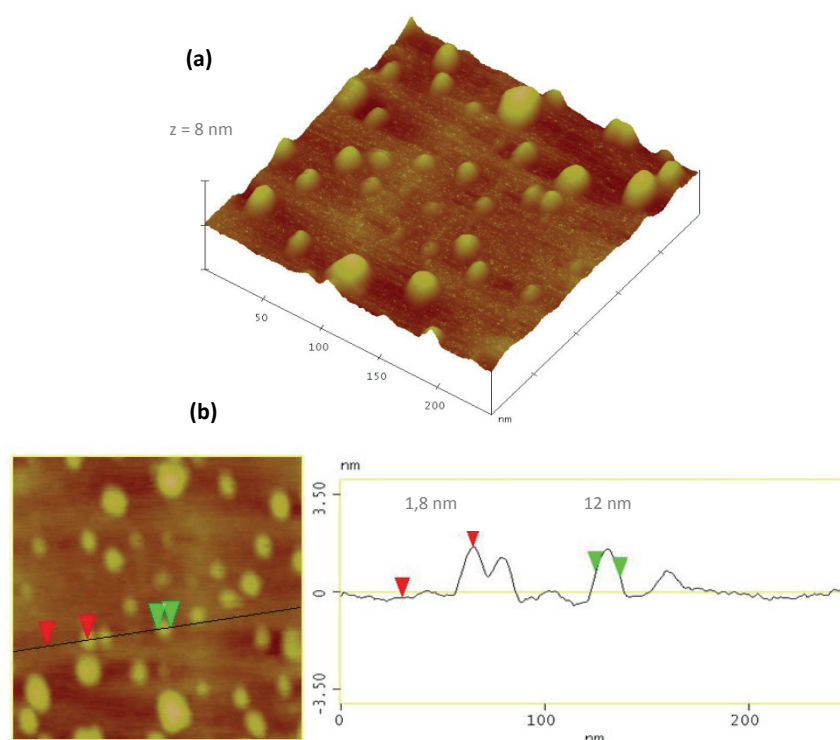


Figura 3.9 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM mista 80% $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$: 20% $\text{HS}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ e **(b)** Análise de secção da proteína.

A monocamada mista covalente/hidrofóbica de 90% DSP : 10% C₄SH (figura 3.10) revelou uma superfície com distintas regiões com e sem proteína, semelhante a um “favo de mel”. Este tipo de estrutura foi anteriormente observado na imobilização da lacase numa SAM mista 20 : 1 (DSP : C₄SH), em que foi considerada como um resultado pouco satisfatório e sugeridos ensaios posteriores com SAM mistas com diferentes percentagens de cada um destes componentes [8].

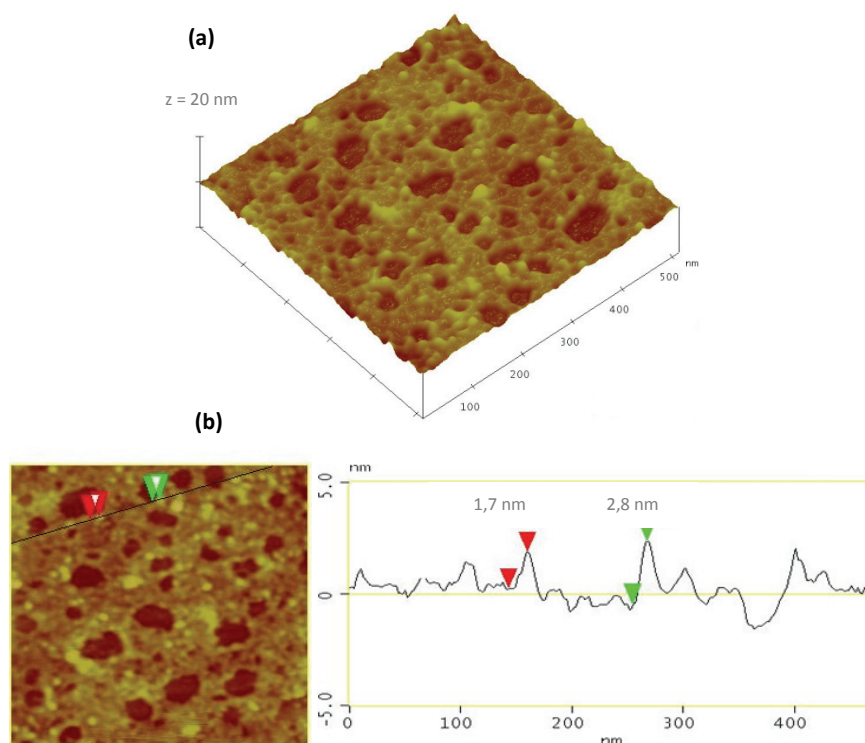


Figura 3.10 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM mista covalente 90% DSP (C₁₄H₁₆N₂O₄S₂) : 10% HS(CH₂)₃CH₃ e **(b)** Análise de secção da proteína.

3.3.2.3 Caracterização da ferroquelatase imobilizada covalentemente em monocamadas auto-montadas à superfície de ouro

Com o objectivo de se aumentar a adsorção da proteína à SAM aniónica, o grupo terminal COOH foi activado com os agentes de acoplamento EDC/NHS, formando-se uma ligação covalente entre a ferroquelatase e a SAM, tal como descrito em [12].

Verificou-se que a ferroquelatase adsorve a esta monocamada em grande extensão, apresentando a formação de alguns agregados, como é visível na figura 3.11, comparativamente com a menor adsorção da proteína nas SAM anteriormente analisadas, nas quais a adsorção ocorreu por via electrostática ou hidrofóbica, sendo a maior diferença observada em comparação com a SAM aniónica pura.

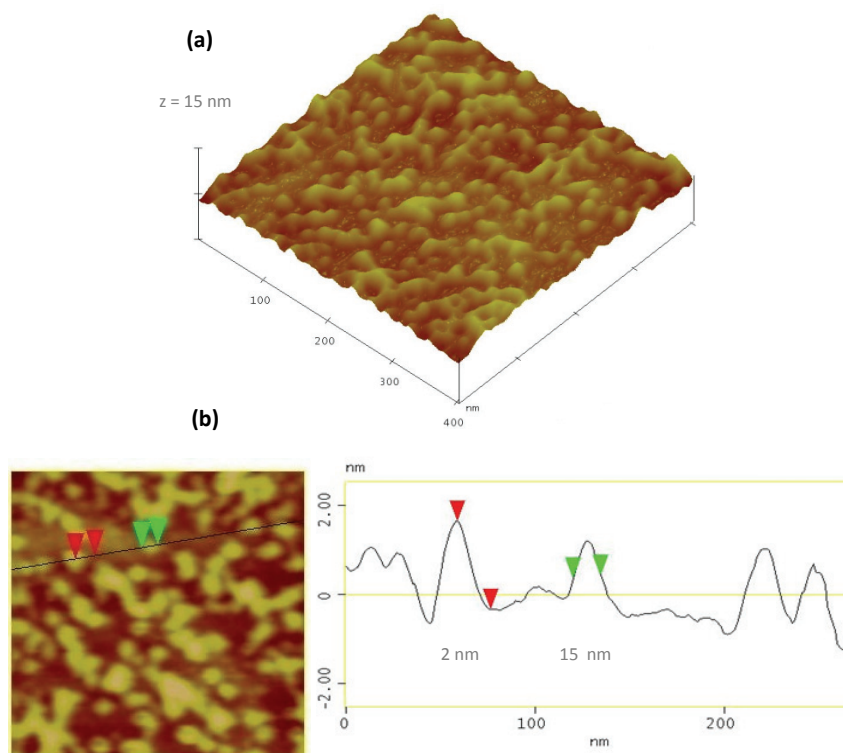


Figura 3.11 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ activada com EDC/NHS e **(b)** Análise de secção da proteína.

A ligação covalente da proteína à monocamada também foi testada pelo uso da SAM de DSP puro. Uma elevada adsorção da proteína sob a forma individualizada foi observada nesta monocamada, como ilustra a figura 3.12.

Comparando as imagens de AFM da SAM de DSP puro e da SAM mista covalente/hidrofóbica (90% DSP : 10% C_4SH) anteriormente descrita, observaram-se diferenças na distribuição da proteína à superfície da monocamada. Verifica-se uma adsorção da ferroquelatase de forma globular na SAM de DSP puro, comparativamente com a SAM mista contendo DSP, em que se obtiveram estruturas de proteína distendida do tipo “favo de mel”, como se pode constatar por comparação das figuras 3.10 e 3.12.

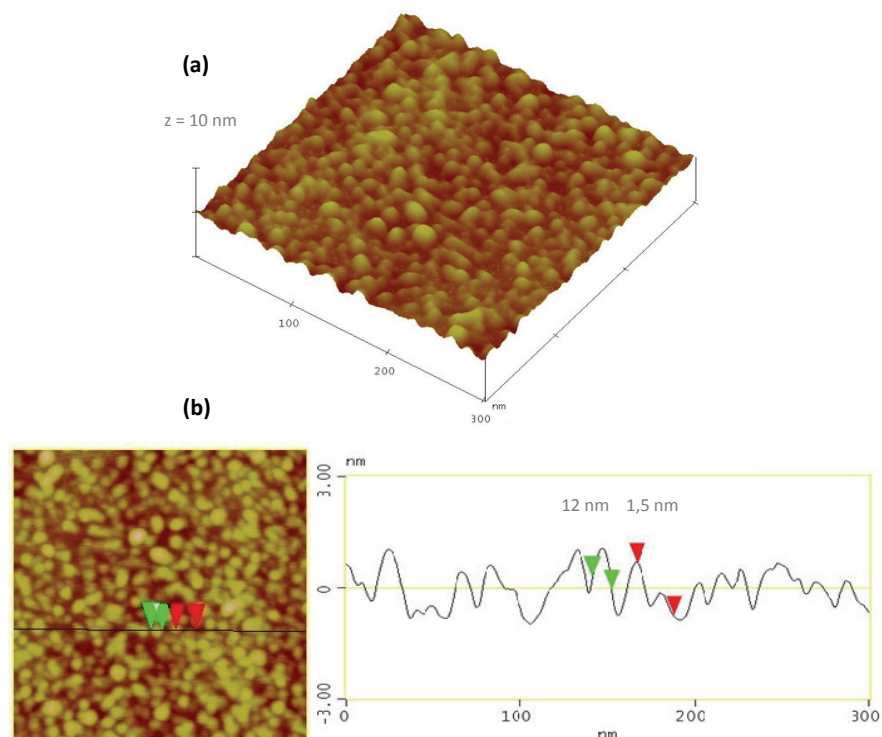


Figura 3.12 (a) Imagem topográfica de AFM em 3 dimensões (3D) das moléculas de ferroquelatase adsorvidas à SAM de DSP puro e **(b)** Análise de secção da proteína.

3.4 Discussão de Resultados

Pela análise dos resultados verificou-se que a ferroquelatase adsorveu com sucesso em todas as monocamadas estudadas: sejam puras ou mistas, em que a adsorção ocorreu por via electrostática ou hidrofóbica por forças de Van der Waals, assim como por ligação covalente em SAM à superfície de ouro.

A adsorção da proteína ocorreu maioritariamente sob a forma individualizada com uma distância horizontal de 10 a 17 nm e uma distância vertical de 0,8 a 4 nm, como representado na tabela 3.2.

Tabela 3.2 Medidas de distância horizontal e vertical da ferroquelatase em cada uma das SAM analisadas por AFM.

SAM	Análise de secção da ferroquelatase	
	Distância horizontal (nm)	Distância vertical (nm)
SAM puras		
Neutra-hidrofóbica	11	1,4
Catiónica	14	1,3
Aniónica	17	4
SAM mistas		
50% aniónica : 50% hidrofóbica	10	0,8 / 1,7
80% aniónica : 20% hidrofóbica	12	1,8
90% DSP : 10% C ₄ SH	12 / 16	1,7 / 2,8
Ligação covalente		
SAM de COOH activada com EDC/NHS	15	2
SAM de DSP puro	12	1,5

Para a proteína nas SAM de alcanotióis foi medida uma largura entre 10 e 17 nm e uma altura entre 0,8 e 4 nm. A altura obtida por AFM é na maior parte dos casos estudados inferior às menores dimensões determinadas por cristalografia de raios-X da ferroquelatase humana, em que o monómero tem uma dimensão de aproximadamente 65 x 45 x 40 Å³ [14]; enquanto que a largura obtida por AFM é mais do dobro da maior dimensão cristalográfica.

A técnica de AFM é reconhecida pela precisão na medição da altura de biomoléculas na superfície [15] e não tanto pela resolução lateral que depende muito da forma/qualidade da ponta; o que justifica claramente as larguras medidas serem superiores à esperada. Outros factores podem explicar o aumento da largura, como o facto da proteína se poder encontrar nas SAM sob a forma dimérica, dado que cristaliza como um dímero [14]; e também a alteração da forma da proteína quando esta interage com a superfície, especialmente se tiver muitos locais de interacção como parece acontecer com a superfície hidrofóbica e catiónica.

Relativamente à altura medida ser inferior à esperada (com excepção da SAM aniónica, cuja altura é de 4 nm, possivelmente pelo facto da proteína aparecer sob a forma

de aglomerados), esta pode ser condicionada igualmente pela alteração da forma da proteína ao interagir com a superfície e pode ainda ser explicada pela interacção da ponta com a superfície maleável da proteína.

Os valores de diâmetro horizontal e vertical medidos são da mesma ordem de grandeza dos apresentados por Bonanni e colaboradores [16], no que respeita a análise de secção do citocromo *c* de levedura (YCc) adsorvido no substrato de ouro. Este citocromo apresentou uma altura média de $2,6 \pm 0,7$ nm e uma largura no intervalo de 20-30 nm. Estes autores verificaram que a largura medida é superior aos resultados cristalográficos de raios-X do YCc, devido ao efeito de alargamento da ponta, tal como observado no presente estudo.

A proteína adsorveu preferencialmente na SAM pura neutra-hidrofóbica relativamente às SAM catiónica ou aniónica, o que se pode tentar explicar pela análise dos potenciais de superfície electrostáticos da proteína. Espera-se que estas últimas SAM estabeleçam interacções electrostáticas com a proteína, dado que a monocamada de COOH com um pK_a de cerca de 6,5 [12] deve estar desprotonada a pH 8 e assim estará disponível para estabelecer uma interacção electrostática com as superfícies catiónicas da proteína; enquanto que a monocamada de NH_2 com um pK_a entre 6,4 e 6,8 [11] deve estar parcialmente protonada a pH 6,5 e pode estabelecer assim interacção electrostática com as superfícies aniónicas da proteína.

Os potenciais de superfície electrostáticos da estrutura tridimensional (3D) de raios-X da ferroquelatase humana foram assim analisados com o objectivo de relacionar estes potenciais com a distribuição da proteína nas diferentes SAM à superfície de ouro. Utiliza-se a estrutura da ferroquelatase humana uma vez que esta apresenta uma sequência em aminoácidos 88% homóloga à sequência de aminoácidos da ferroquelatase de fígado de rato [6], para a qual ainda não é conhecida a estrutura cristalográfica de raios-X.

A figura 3.13 mostra uma distribuição de cargas difusa à superfície da proteína, sem zonas alargadas carregadas positiva ou negativamente. Esta observação pode explicar a distribuição da proteína na monocamada à superfície de ouro, uma vez que a ferroquelatase adsorve preferencialmente em superfícies de ouro neutras, relativamente a superfícies carregadas.

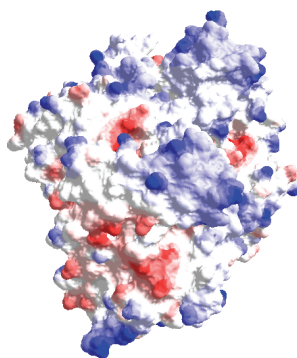


Figura 3.13 Potenciais electrostáticos de superfície da estrutura 3D de raios-X da ferroquelatase humana (código de acesso PDB: 1HRK), com uma distribuição de cargas uniforme em que não existe qualquer face extensa preferencial para contacto com a SAM, que seria caracterizada por uma concentração de resíduos carregados positiva ou negativamente. As zonas representadas a vermelho correspondem aos potenciais negativos e a azul aos potenciais positivos, num intervalo de potenciais de -5 a 5 KTe^{-1} . As figuras foram preparadas usando o utilitário Swiss-Pdb Viewer 3.7.

Nas SAM mistas, a ferroquelatase apresentou uma maior adsorção em 50% COO^- : 50% CH_3 , comparativamente com a SAM 80% COO^- : 20% CH_3 , o que pode ser explicado pelo facto da proteína preferir SAM hidrofóbicas. Deste modo, ao se variar as percentagens de CH_3 e COO^- uma maior adsorção da ferroquelatase é esperada na monocamada com uma maior percentagem da SAM hidrofóbica, como efectivamente é comprovado pelas imagens de AFM.

Observou-se uma elevada adsorção de proteína por ligação covalente à SAM de COOH , pelo facto desta monocamada ter sido activada com EDC/NHS, comparativamente com a ligação electrostática que ocorre entre a ferroquelatase e a SAM aniónica pura.

A elevada imobilização covalente da ferroquelatase também foi observada na SAM de DSP puro, na qual a proteína se apresenta sob a forma globular, contrariamente à forma menos globular presente na SAM mista (90% DSP : 10% C_4SH). Esta última monocamada não parece assim adequada para a obtenção de proteína adsorvida na forma globular e provavelmente activa, uma vez que a proteína se apresenta em estruturas distendidas do tipo “favo de mel” provavelmente correspondentes a proteína desnaturada.

Tendo como objectivo a formação de superfícies modificadas com ferroquelatase com propriedades catalíticas, foram realizados estudos preliminares para se determinar a actividade da proteína adsorvida, mas por razões experimentais tal ainda não foi possível.

3.5 Conclusões

Neste capítulo a imobilização da ferroquelatase recombinante de fígado de rato em SAM à superfície de ouro foi comprovada e caracterizada por medidas de AFM.

A proteína adsorveu em todas as monocamadas estudadas, por via electrostática ou hidrofóbica e por via covalente. Nos sistemas de adsorção não covalente, observou-se uma maior adsorção da ferroquelatase na SAM pura neutra-hidrofóbica e na SAM mista 50% COO⁻ : 50% CH₃. A ferroquelatase também adsorveu em grande extensão por via covalente na SAM de COOH activada por EDC/NHS e na SAM de DSP puro.

Os resultados permitiram concluir que apesar da ligação covalente constituir um modo preferencial de imobilização de proteínas em superfícies, a adsorção de proteínas por interacções mais fracas do tipo Van der Waals ou electrostáticas, permite igualmente uma imobilização apreciável de proteína. Tal apresenta vantagens do ponto de vista da manutenção da actividade enzimática, já que a ligação covalente ao utilizar cadeias laterais de resíduos da cadeia polipeptídica, pode ser responsável por alterações estruturais na proteína, com consequências para a sua actividade enzimática. Assim, o modo de adsorção da proteína à superfície de ouro poderá determinar o tipo de SAM a usar e a capacidade de controlar a adsorção da ferroquelatase na superfície de ouro, podendo ajudar a definir superfícies promissoras para o desenvolvimento de biossensores com elevada especificidade.

3.6 Bibliografia

- [1] You, C. C.; De, M.; Rotello, V. M. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9*, 639-646.
- [2] Al-Karadaghi, S.; Franco, R.; Hansson, M.; Shelnutt, J. A.; Isaya, G.; Ferreira, G. C. *TRENDS in Biochemical Sciences* **2006**, *31*, 135-142.
- [3] Medlock, A.; Swartz, L.; Dailey, T. A.; Dailey, H. A.; Lanzilotta, W. N. *PNAS* **2007**, *104*, 1789-1793.
- [4] Hansson, M. D.; Lindstam, M.; Hansson, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 325-333.
- [5] Quintas, A.; Freire, A. P.; Halpern, M. J. *Bioquímica, Organização Molecular da Vida*; Lidel - Edições Técnicas, Lisboa, Portugal, 2008.
- [6] Ferreira, G. C.; Moura, J. J. C.; Franco, R. *Iron Metabolism, Inorganic Biochemistry and Regulatory Mechanisms*; WILEY-VCH, 1999.
- [7] Franco, R.; Ma, J.-G.; Lu, Y.; Ferreira, G. C.; Shelnutt, J. A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 2517-2529.
- [8] Cabrita, J. F.; Abrantes, L. M.; Viana, A. S. *Electrochimica Acta* **2005**, *50*, 2117-2124.
- [9] Chen, S.; Liu, L.; Zhou, J.; Jiang, S. *Langmuir* **2003**, *19*, 2859-2864.
- [10] Ferreira, G. C. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4396-4400.
- [11] Munakata, H.; Oyamatsu, D.; Kuwabata, S. *Langmuir* **2004**, *20*, 10123-10128.
- [12] Wang, Z.-H.; Viana, A. S.; Jin, G.; Abrantes, L. M. *Bioelectrochemistry* **2006**, *69*, 180-186.
- [13] Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. In *The Proteomics Protocols Handbook*; Walker, J. M.; Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005.
- [14] Wu, C.-H.; Dailey, H. A.; Rose, J. P.; Burden, A.; Sellers, V. M.; Wang, B.-C. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 156-160.
- [15] Valério, E.; Abrantes, L. M.; Viana, A. S. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 2467-2474.
- [16] Bonanni, B.; Alliata, D.; Bizzarri, A. R.; Cannistraro, S. *Chemphyschem* **2003**, *4*, 1183-1188.

PARTE II. Interacção de Proteínas com Nanopartículas de Ouro



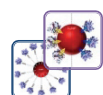
CAPÍTULO 4

FORMAÇÃO DE BIONANOCONJUGADOS CITOCROMO C - NANOPARTÍCULAS DE OURO



CAPÍTULO 5

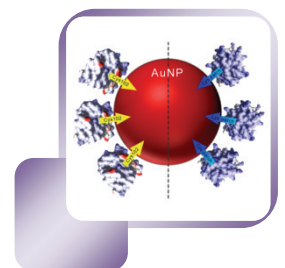
FORMAÇÃO DE BIONANOCONJUGADOS CITOCROMO C - NANOPARTÍCULAS DE OURO
FUNCIONALIZADAS



CAPÍTULO 6

ESTUDO DO EFEITO DO PH NOS BIONANOCONJUGADOS - PERSPECTIVA DE UTILIZAÇÃO COMO
BIOSSENSOR

CAPÍTULO 4. FORMAÇÃO DE BIONANOCONJUGADOS CITOCROMO C - NANOPARTÍCULAS DE OURO



4.1 Introdução

As nanopartículas de ouro (AuNP) têm sido extensivamente estudadas pelas suas propriedades ópticas únicas, responsáveis pela vasta aplicação em ensaios biológicos, diagnóstico clínico e terapêutico [1, 2].

Neste contexto, o estudo de interacção entre proteínas e AuNP reveste-se de especial importância devido à elevada afinidade entre ambas, que conduz à formação de bionanoconjugados propícios para interacções biológicas [1, 3-9].

A caracterização dos processos físicos envolvidos na interacção de proteínas com AuNP e a estabilidade e robustez dos bionanoconjugados é assim de extrema relevância [10, 11].

No presente capítulo é descrita a formação e caracterização de bionanoconjugados formados pela interacção de proteínas - citocromo c de coração de cavalo ou citocromo c de levedura com nanopartículas de ouro revestidas com citrato de sódio.

A formação dos bionanoconjugados foi demonstrada por medidas de potencial zeta (ζ -potencial), dispersão de luz dinâmica (DLS), espectroscopia de UV-visível e visualizada por microscopia de força atómica (AFM) e microscopia electrónica de transmissão (TEM). Os diferentes modos de ligação das proteínas estudadas às AuNP avaliados por dicroísmo circular (CD), conduzem a diferentes propriedades de superfície dos bionanoconjugados.

As AuNP são sintetizadas pela redução química de um sal de ouro (III) a ouro metálico, na presença de um agente de revestimento com forte afinidade para o ouro, como o citrato de sódio, ou outros agentes de revestimento como tióis, aminas e carboxilatos [2]. O método mais comum para preparação das AuNP é o método de redução de citrato de sódio, desenvolvido por Turkevich em 1951 [12].

As soluções coloidais de AuNP esféricas são vermelhas devido à oscilação colectiva de electrões condutores, designada por ressonância plasmónica superficial (SPR) [13]. Esta banda de SPR está centrada em redor dos 520 nm para AuNP esféricas, sendo o seu comprimento de onda fortemente dependente da forma da AuNP e da distância inter-partícula [14, 15], e sensível ao tamanho da partícula e ao índice de refacção do meio [16-18].

O citocromo *c* (Cyt *c*) é uma proteína de baixa massa molecular (cerca de 12 kDa), que contém um grupo hemo. O Cyt *c* pode ser facilmente obtido na sua forma pura e mantém-se estável em solução, sendo resistente à desnaturação e a alterações da sua estrutura tridimensional nativa em condições adversas de temperatura, pH e força iónica [19].

O citocromo *c* proveniente de coração de cavalo (HCc) é considerado como uma proteína modelo (amplamente estudada) devido às suas funções biológicas, pois é responsável pelo transporte de electrões na cadeia respiratória dos organismos aeróbios e desempenha um importante papel na apoptose (morte celular programada) [20-22].

O citocromo *c* derivado de levedura unicelular *Saccharomyces cerevisiae* (YCc) tem particular interesse por conter um único resíduo de cisteína livre à superfície (cisteína 102), que se pode utilizar para ligação a um substrato de ouro, permitindo orientar a proteína, para uma transferência electrónica rápida e reversível, o que lhe permite ser explorado para aplicações em bioelectrónica, biossensores e biocatálise [23-25]. As sequências de aminoácidos das duas proteínas estudadas são altamente homólogas, pois apresentam 80% de similaridade (como determinado pelo utilitário para alinhamento da sequência de aminoácidos - CLUSTAL W [26]), no entanto, o YCc não pode substituir o HCc em certos aspectos de regulação celular, como por exemplo na activação de proteases como a caspase [21]. Tanto YCc como HCc apresentam uma região rica em lisinas na sua estrutura tridimensional, em que a carga é positiva a pH neutro, permitindo interações electrostáticas dos citocromos *c* com outras proteínas envolvidas em transferência electrónica [27, 28]. Em YCc, o resíduo de cisteína 102 localiza-se próximo da superfície que expõe o resíduo de glutamato do terminal C, e no lado oposto à região rica em lisinas [23], o que permite uma ligação covalente às AuNP, contrariamente à ligação do HCc. Uma vez que o HCc não possui o resíduo de cisteína livre, a interacção com a superfície do metal ocorre por via electrostática entre a carga negativa do citrato que reveste as AuNP, e a carga positiva do HCc que lhe é conferida pela região rica em lisinas, mesmo a pH básico.

Este trabalho demonstra a formação de bionanoconjugados estáveis compostos por AuNP e citocromos *c*. Esta formação foi comprovada por um desvio de 5 nm da banda de ressonância plasmónica superficial das AuNP, aumento do valor de potencial zeta e visualização directa por AFM. As alterações conformacionais das proteínas foram analisadas

por CD, sendo pouco significativas na estrutura secundária da proteína do HCc-AuNP mas apreciáveis em YCc do YCc-AuNP.

Parte dos resultados apresentados neste capítulo encontram-se publicados [29].

4.2 Procedimento Experimental

4.2.1 Preparação dos bionanoconjugados

Os conjugados HCc-AuNP e YCC-AuNP (bionanoconjugados) foram preparados pela incubação durante a noite da solução de AuNP, ajustada a pH 11 (com excepção das medidas de CD em que é ajustada a pH 10) pela adição da solução de NaOH 0,1 M, com a quantidade apropriada da solução de citocromo c, para se obterem os bionanoconjugados Cyt c - AuNP com a razão [Cyt c] / [AuNP] desejada.

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas segundo o método de redução de citrato de sódio [30] como descrito em apêndice IV e as soluções de citocromo c foram preparadas como apresentado no apêndice V.

4.2.2 Medidas de Espectroscopia e Microscopia

4.2.2.1 Espectroscopia de UV-visível

Os espectros de absorção das AuNP (concentração final = 5 nM) e dos bionanoconjugados a pH 11 foram efectuados num espectrofotómetro UV-visível, modelo UV2, UNICAM, em células de quartzo (Hellma, Alemanha), à temperatura ambiente, num intervalo de comprimento de onda de 300 a 900 nm.

4.2.2.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

As experiências de dicroísmo circular foram efectuadas num espectropolarímetro Jasco-810, à temperatura controlada de 25 °C (controlador de temperatura, Julabo) e num intervalo de comprimento de onda de 195 a 260 nm. As amostras (concentração final de AuNP = 12 nM) a pH 10 foram medidas numa cuvete de quartzo (Hellma, Alemanha) de 1 mm de espessura, com uma velocidade de 20 nm min⁻¹, um intervalo entre amostras de 0,1 nm e um tempo de resposta de 16 s.

A análise dos espectros de CD foi realizada online, usando o programa DICHROWEB (www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html) com o algoritmo de determinação de estrutura secundária CDSSTR² [31, 32]. Os resultados foram expressos em elipticidade média por resíduo de aminoácido, $\langle \Theta \rangle$, em deg cm² dmol⁻¹ a 222 nm, sendo os espectros seleccionados os que apresentaram menor razão sinal-ruído. As experiências de CD foram efectuadas no Laboratório de Patologia Molecular do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica.

4.2.2.3 Microscopia de Força Atómica (AFM)

Para os ensaios de AFM as amostras de AuNP e de bionanoconjugados foram centrifugadas durante 25 min. a 9300 rpm (centrífuga 5810R, Eppendorf), seguido da remoção do sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 100 µL de água para biologia molecular (Sigma-Aldrich), e ressuspenso em 60 µL da mesma água, para eliminar cristais de sal e/ou tampão que poderiam afectar as medidas de AFM.

Pipetaram-se 20 µL da amostra para uma mica clivada e deixou-se secar à temperatura ambiente. As imagens foram obtidas com um microscópio de força atómica, Multimode (Veeco), equipado com um controlador Nanoscope IVa.

A AFM foi operada a temperatura ambiente e ao ar, no modo intermitente (“tapping”). Utilizaram-se pontas de silício montadas em braços (“cantilevers”) rectangulares

² A autora agradece ao Dr. Luís M. A. Oliveira a análise dos espectros de CD através do programa DICHROWEB.

com uma frequência de ressonância de cerca de 300 kHz (AppNano, CA) e as imagens foram seleccionadas com base num conjunto de medidas estáveis e reprodutíveis.

As imagens de AFM foram obtidas pelo Doutor Peter Eaton no REQUIMTE/Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

4.2.2.4 Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM)

Depositaram-se 20 μ L da amostra numa matriz de cobre revestida a carbono e secou-se à temperatura ambiente. As imagens de TEM foram obtidas num microscópio HITACHI H-8100, operado com uma voltagem de aceleração de 200 kV e analisadas com o utilitário ImageJ e Origin Pro 8.0, sendo apresentadas as imagens representativas de um conjunto de medidas estáveis e reprodutíveis.

Este trabalho foi realizado pelo Dr. Pedro Quaresma no MicroLab - Laboratório de Microscopia Electrónica do Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa.

4.2.3 Medidas de Dispersão de Luz

As medidas de dispersão de luz dinâmica (DLS) e de potencial zeta (ζ -potencial) foram realizadas usando um Zetasizer Nano-ZS da Malvern Instruments, com um laser de He-Ne (comprimento de onda = 633 nm) a 4 mW e com um ângulo fixo de detecção de 173°, para DLS, e de 17°, para as medidas de potencial zeta. Todas as medidas foram obtidas à temperatura controlada de 25 °C e tiveram início 15 min. após a amostra atingir o equilíbrio térmico. As medidas foram repetidas para se poder estimar o erro associado.

Este estudo foi desenvolvido na Unidade de Biomembranas do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

4.2.3.1 Medidas de Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)

Filtrou-se 1 mL da amostra a pH 11, previamente diluída em água ultra-pura (sistema de água Milli-Q, Millipore, 18,2 MΩ.cm) numa seringa estéril (concentração final de AuNP aproximadamente de 0,3 nM e concentração de Cyt c variável de acordo com a razão desejada), através de um filtro de nylon de 0,45 μm de diâmetro de poro (Whatman) para uma cuvete descartável com tampa (poliestireno, tamanho 10 x 10 x 48 mm, Sarsted, Alemanha) e agitou-se. Mediu-se a absorvância da amostra ao comprimento de onda de 633 nm. Efectuaram-se medições de DLS 15 vezes em cada amostra e em cada medida foram realizadas de 13 a 45 aquisições.

Pelo utilitário da Malvern (incorporado no equipamento), a função de auto-correlação da intensidade de luz dispersa foi analisada pelo programa CONTIN (transformação inversa de Laplace [33, 34]), e o diâmetro hidrodinâmico, d (H), foi calculado usando a equação de Stokes-Einstein (equação 1):

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

d (H) descreve o diâmetro hidrodinâmico, D o coeficiente de difusão translacional, k a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta e η a viscosidade.

4.2.3.2 Medidas de Potencial Zeta (ζ-potencial)

Filtrou-se 1 mL da amostra a pH 11, previamente diluída em água ultra-pura numa seringa estéril (concentração final de AuNP aproximadamente de 3 nM e concentração de Cyt c variável de acordo com a razão desejada), através de um filtro de nylon de 0,45 μm de diâmetro de poro (Whatman), transferiu-se lentamente para uma célula limpa de potencial zeta (poliestireno com eléctrodos metálicos revestidos a ouro, Malvern, UK), de forma a garantir que a amostra não possui bolhas de ar dentro da célula e que os eléctrodos estão completamente imersos quando da colocação das tampas nas extremidades, e por último foram colocadas as placas de contacto térmico (proporcionam uma maior estabilidade da

temperatura). Cada amostra foi medida 25 vezes e em cada medida foram realizadas 65 aquisições.

O valor de potencial zeta foi calculado pelo utilitário da Malvern através da equação de Henry (equação 2), que relaciona a mobilidade electroforética com o ζ -potencial.

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta}f(kR) \quad (2)$$

U_E é a mobilidade electroforética, ε e η são a constante dieléctrica e a viscosidade do solvente, respectivamente, ζ é o potencial zeta e $f(kR)$ a função de Henry.

A função de Henry foi aproximada pela aproximação de Smoluchowski, $f(kR) = 1,5$, devido ao facto das medidas de potencial zeta terem sido realizadas em solução aquosa.

Os dados obtidos para as diferentes razões [Cyt c] / [AuNP] foram ajustados a uma isotérmica de adsorção de Langmuir, usando o utilitário Origin Pro 8.0.

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterização das nanopartículas de ouro

A solução de AuNP a pH 11 exibiu cor vermelha e uma banda de SPR a 520 nm, como expectável para este tipo de solução coloidal e confirmado por espectroscopia de UV-visível (secção 4.3.3).

O diâmetro médio das AuNP foi determinado por AFM, DLS e TEM.

As medidas de AFM (secção 4.3.4) revelaram um diâmetro médio para as nanopartículas de $11,5 \pm 1,7$ nm em concordância com o valor de diâmetro hidrodinâmico de $11,7 \pm 1,6$ nm determinado por DLS (secção 4.3.2.1).

O valor de diâmetro médio das AuNP calculado por TEM a partir da contagem de 1754 AuNP foi de $13,9 \pm 3,3$ nm, como ilustra o histograma da figura 4.1. Este valor de diâmetro está em conformidade com os valores determinados por AFM e DLS, tendo em consideração as limitações das diferentes técnicas.

As AuNP apresentam uma forma esférica e estão dispersas individualmente como se pode observar na figura 4.2.

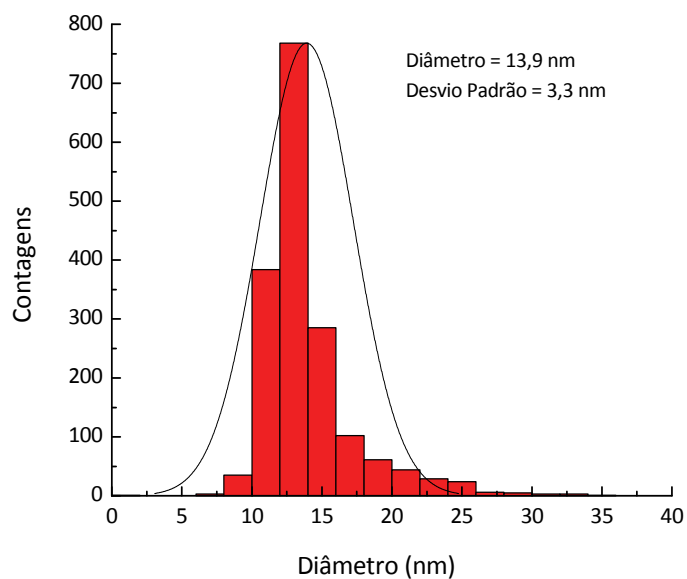


Figura 4.1 Histograma de distribuição de tamanhos da contagem de 1754 AuNP com diâmetro médio de $13,9 \pm 3,3$ nm.

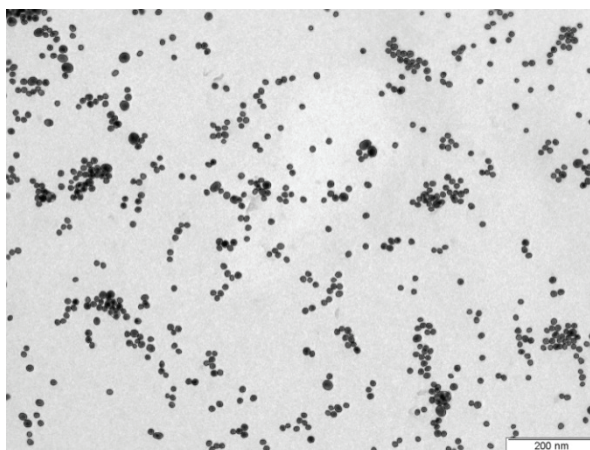


Figura 4.2 Imagem de TEM da solução de AuNP a pH 11. A barra de escala corresponde a 200 nm.

4.3.2 Avaliação da superfície de revestimento dos bionanoconjugados

Para comprovar a formação dos bionanoconjugados HCc-AuNP e YCc-AuNP foram realizadas medidas de DLS e de potencial zeta das AuNP com diferentes concentrações de proteína (Cyt c).

4.3.2.1 Medidas de Dispersão de Luz Dinâmica

A dispersão de luz dinâmica permite determinar o diâmetro hidrodinâmico dos bionanoconjugados e avaliar a cobertura de superfície das AuNP pela proteína.

Os bionanoconjugados HCc-AuNP apresentaram valores de d (H), muito próximos dentro do erro, aos valores de d (H) da solução de AuNP ($11,7 \pm 1,6$ nm) como ilustra a figura 4.3 a. Este resultado pode indicar que não ocorre formação de bionanoconjugados, no entanto este resultado será contraposto pelas medidas de potencial zeta (secção 4.3.2.2), que mostram que os bionanoconjugados são de facto formados mesmo a razões [Cyt c] / [AuNP] baixas.

No que respeita aos bionanoconjugados YCc-AuNP, os valores de d (H) aumentaram cerca de 7 nm até à razão [Cyt c] / [AuNP] de 45, a partir desta razão os resultados são condicionados pela agregação das nanopartículas (figura 4.3 b). Em HCc-AuNP a agregação ocorreu acima da razão de 60.

Para as proteínas sozinhas, o valor de d (H) é de $2,5 \pm 0,2$ nm para HCc e de $2,7 \pm 0,2$ nm para YCc, sendo estes valores de d (H) uma média dos valores obtidos para três concentrações diferentes de proteína (50, 100 e 150 μ M). Estes resultados foram concordantes com os valores de diâmetro teórico calculados pelo programa Malvern (http://www.malvern.co.uk/common/concentration_calc/concentration_calc.htm), com base no valor da massa molecular da proteína e assumindo que se trata de uma proteína globular.

Os valores de diâmetro hidrodinâmico para ambos os bionanoconjugados são representados na figura 4.3 a razões [Cyt c] / [AuNP] entre 0 e 60.

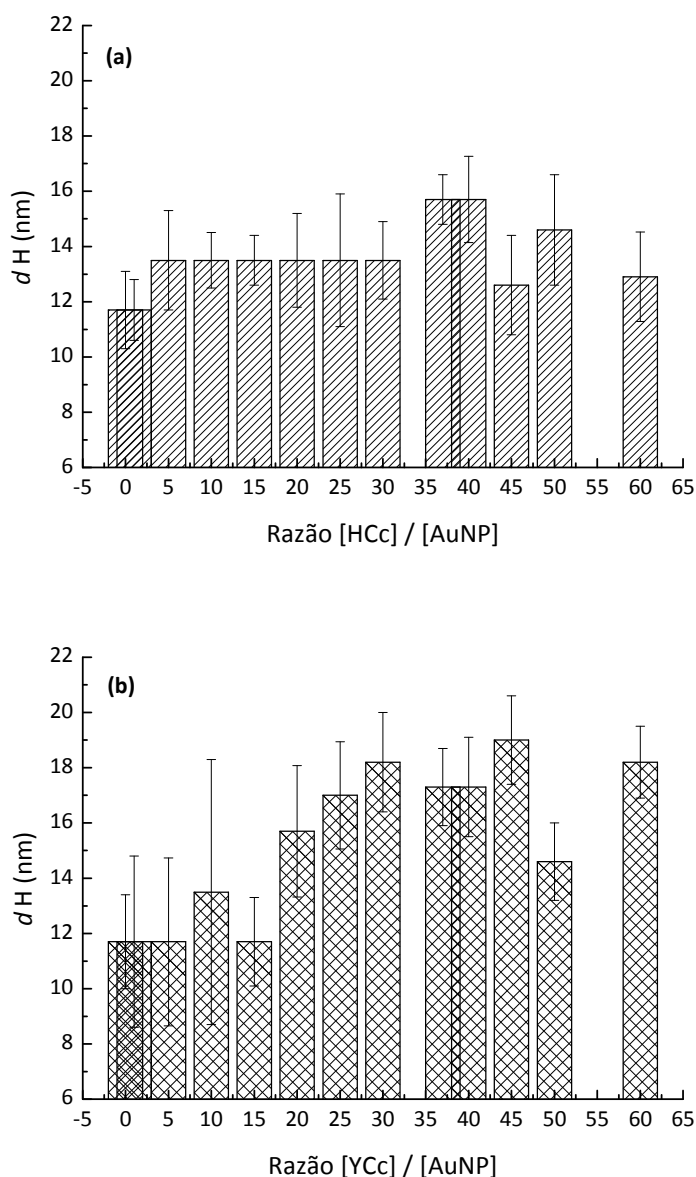


Figura 4.3 (a) Diâmetro hidrodinâmico dos bionanoconjugados HCC-AuNP em função da razão [HCC] / [AuNP] a pH 11 e **(b)** Diâmetro hidrodinâmico dos bionanoconjugados YCC-AuNP em função da razão [YCC] / [AuNP] a pH 11. Cada barra corresponde a uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio.

A agregação foi um factor que afectou as medidas de DLS sendo detectada a razões [Cyt c] / [AuNP] muito baixas e por este motivo não são apresentados resultados para razões superiores a 60. A DLS é muito sensível à agregação, mesmo de agregados de pequena dimensão, como também foi observado por outros autores [35].

Independentemente do método usado no tratamento dos resultados, no que respeita ao isolamento da contribuição de grandes agregados a partir dos histogramas de distribuição de tamanhos, a elevada contribuição destes não permitiu a utilização dos resultados obtidos. Esta técnica é mais sensível a partículas com um maior diâmetro hidrodinâmico, uma vez que a intensidade de dispersão de luz é proporcional a d^6 [36]. Assim, a intensidade de dispersão de luz proveniente destas, pode mascarar a dispersão de luz proveniente de partículas com um menor d (H), sendo a DLS uma técnica com menor sensibilidade para partículas de menores dimensões existentes numa mistura. Pelas razões referidas a DLS não foi a técnica mais adequada para este estudo.

4.3.2.2 Medidas de Potencial Zeta

O potencial zeta mede o potencial eléctrico à superfície dos bionanoconjugados. A grandeza deste potencial de superfície está relacionada com a carga da superfície e a espessura da dupla camada, dependendo assim da quantidade de proteína (considerada como um polímero carregado) adsorvida à superfície do bionanoconjugado. É esperado que com o aumento da concentração de Cyt c, a carga de superfície aumente até atingir um valor estável quando deixar de ser possível adsorver mais proteína ao bionanoconjugado. O mesmo se verificou noutros trabalhos de investigação apresentados na literatura, referentes à adsorção de proteínas em partículas de cerâmica [37] e determinação da superfície de cobertura de pontos quânticos (“quantum dots”) pela enzima P450 [36].

Para se medir os valores de potencial zeta, as soluções de AuNP e de bionanoconjugados foram preparadas como descrito no procedimento experimental. Incubaram-se concentrações crescentes de ambos os citocromos com a mesma concentração de AuNP, ocorrendo assim um aumento sucessivo da razão, até 500 moléculas de proteína por AuNP, à temperatura constante de 25 °C.

A solução de AuNP apresentou um potencial zeta de $-49,0 \pm 4,2$ mV, concordante com o apresentado na literatura [3].

Para os bionanoconjugados HCC-AuNP, o potencial zeta aumenta até à razão [HCC] / [AuNP] de 200, apresentando um valor de potencial de $-30,5 \text{ mV} \pm 1,1 \text{ mV}$, que se mantêm com valores aproximados nas razões mais elevadas, como ilustra a figura 4.4.

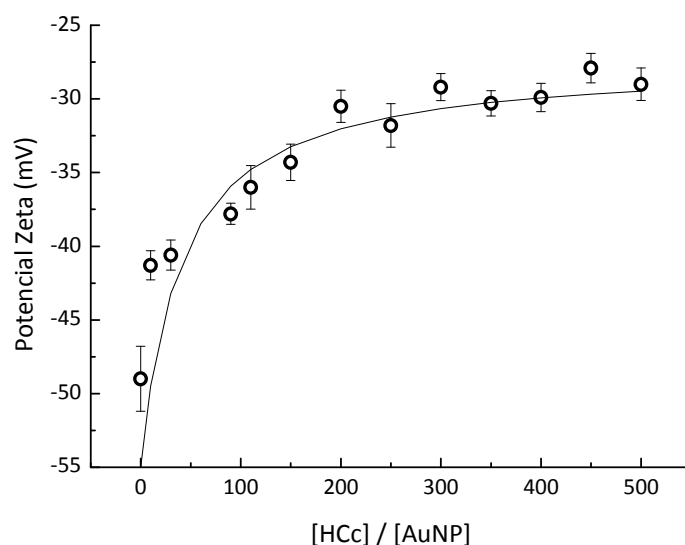


Figura 4.4 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HCc-AuNP em função da razão $[HCc] / [AuNP]$ a pH 11. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio. A linha preta representa o ajuste a uma isotérmica de adsorção de Langmuir (equação 3).

O potencial zeta dos bionanoconjugados HCc-AuNP é cerca de 20 mV menos negativo do que o obtido para a solução de AuNP, o que parece indicar que o HCc transmite carga de superfície mais positiva às AuNP.

O mesmo se verifica para os bionanoconjugados YCc-AuNP, em que o potencial zeta aumenta até atingir o valor de $-35,3 \text{ mV} \pm 2,4 \text{ mV}$ à razão $[YCc] / [AuNP]$ de 200, mantendo um valor praticamente constante a partir desta razão (figura 4.5).

As proteínas em solução apresentaram um potencial zeta próximo de 0 mV ($-0,30 \pm 1,4 \text{ mV}$) para YCc e $-14,3 \text{ mV} \pm 1,6 \text{ mV}$ para HCc. Estes valores de potencial zeta foram obtidos a duas concentrações diferentes de proteína (1,5 e 10 μM), sendo reproduzíveis.

O facto de ambas as proteínas apresentarem valores de potencial zeta próximos de zero, pode ser explicado pelas medidas terem sido realizadas a pH 11.

Este pH é próximo do ponto isoeléctrico (pI) de ambas as proteínas (pI = 9,6 para o HCc e pI = 9,5 para o YCc, como determinado pelo programa “Compute pI/Mw” do portal ExPASy [38]).

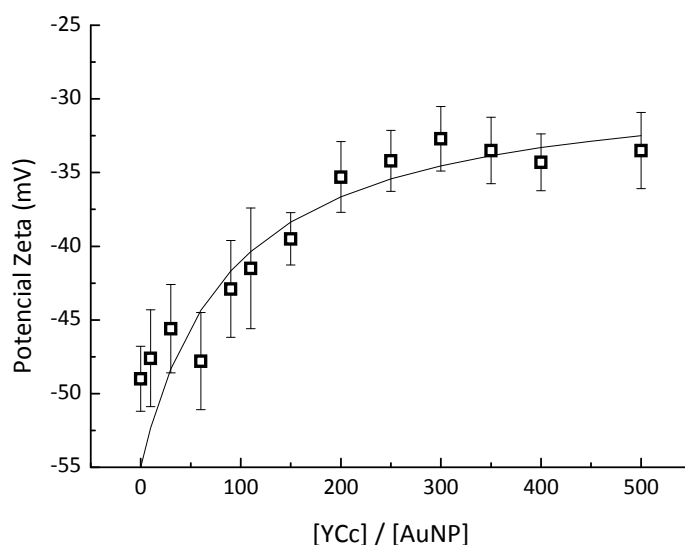


Figura 4.5 Potencial Zeta dos bionanoconjugados YCc-AuNP em função da razão $[YCc] / [AuNP]$ a pH 11. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio. A linha preta representa o ajuste a uma isotérmica de adsorção de Langmuir (equação 3).

Em estudos de adsorção de proteína à superfície de ouro a temperatura constante, a isotérmica de adsorção de Langmuir pode ser ajustada às alterações de frequência do cristal de quartzo de ouro como função da concentração de proteína [3, 39]. A partir destes resultados, torna-se possível estabelecer para este trabalho um paralelismo entre as alterações de frequência e o potencial zeta, constituindo este uma medida indirecta da adsorção de proteína.

O potencial zeta está relacionado com a carga de superfície da porção de proteína adsorvida à AuNP, os resultados obtidos ilustram que quanto mais proteína adsorve à superfície da nanopartícula, mais o potencial zeta do bionanoconjugado aumenta, até que estabiliza (figuras 4.4 e 4.5), o que corresponde a uma cobertura homogênea da superfície da AuNP pela proteína.

As figuras mostram o potencial zeta para cada bionanoconjugado em função da razão $[Cyt\ c] / [AuNP]$, sendo os pontos experimentais ajustados pela isotérmica de adsorção de Langmuir, usando a equação 3 no utilitário Origin Pro 8.0. Os parâmetros obtidos para o ajuste dos dados experimentais estão representados na tabela 4.1.

$$\zeta = \frac{\zeta_{\max} K_L R}{1 + K_L R} \quad (3)$$

ζ é o ζ -potencial medido para o bionanoconjugado com a superfície de cobertura $R = [\text{Cyt } c] / [\text{AuNP}]$, $\zeta_{\max}$ é o valor máximo de ζ -potencial e K_L é a constante de ligação, que corresponde ao valor do inverso das razões de concentração ($1/R$), para metade do $\zeta_{\max}$.

Tabela 4.1 Parâmetros de ajuste da isotérmica de adsorção de Langmuir a partir da equação 3, para ambos os bionanoconjugados.

	$\zeta_{\max}$ (mV)	K_L	$\zeta_{\max} \cdot K_L$ (mV)
HCc-AuNP	$-27,4 \pm 2,4$	$0,025 \pm 0,010$	-0,69
YCc-AuNP	$-28,4 \pm 3,1$	$0,011 \pm 0,004$	-0,31

De acordo com a teoria da isotérmica de adsorção de Langmuir, o $\zeta_{\max} \cdot K_L$ está relacionado com alterações de entalpia que ocorrem no processo de adsorção [40].

O número efectivo de moléculas de proteína presentes numa camada de proteína pode ser calculado assumindo um empacotamento máximo de proteínas à superfície da nanopartícula de ouro, ou seja, um empacotamento cúbico de face centrada. Assim sendo, foi possível determinar o número de moléculas de citocromo *c* que teoricamente podem adsorver à superfície da AuNP (consultar apêndice VI).

Foi necessário considerar a adsorção de duas monocamadas para cada bionanoconjugado (correspondendo a 212 moléculas de HCc ou 188 moléculas de YCc por cada AuNP) de modo a explicar a estabilização dos valores de potencial zeta em cerca de 200 moléculas de proteína por cada AuNP.

O ajuste dos dados de potencial zeta pela isotérmica de adsorção de Langmuir assume que a adsorção não excede uma única monocamada, no entanto, foi considerado que a proteína adsorve em 2 monocamadas, propondo-se um modelo dinâmico de adsorção na discussão de resultados.

Para se garantir que a carga de superfície dos bionanoconjugados se encontra totalmente estável (estando a AuNP completamente recoberta pela proteína), foram preparados bionanoconjugados com uma razão $[\text{Cyt } c] / [\text{AuNP}] = 250$. Na literatura descreve-se uma razão semelhante (200 citocromos por AuNP) [5], com base num estudo espectrofotométrico para a determinação da menor razão de citocromo c necessária para recobrir as AuNP de forma a evitar a agregação induzida por electrólito.

4.3.3 Caracterização dos bionanoconjugados por Espectroscopia de UV-visível

Os bionanoconjugados HCC-AuNP e YCC-AuNP foram preparados à razão de $[\text{Cyt } c] / [\text{AuNP}] = 250$. Ambos os Cyt c com uma concentração final de $1,2 \mu\text{M}$ foram incubados durante a noite com uma solução de AuNP com uma concentração final de 5 nM , a pH 11.

Ambos os bionanoconjugados apresentaram cor vermelha, uma banda de Soret a 408 nm e uma banda de SPR com um comprimento de onda máximo de 525 nm .

A banda de Soret demonstra a presença da proteína e o desvio para o vermelho de 5 nm comparativamente com a banda de SPR a 520 nm apresentada pelas AuNP em solução, corresponde a alterações no índice de refração das AuNP devido à presença da camada de proteína adsorvida, o que comprova a formação dos bionanoconjugados (figura 4.6).

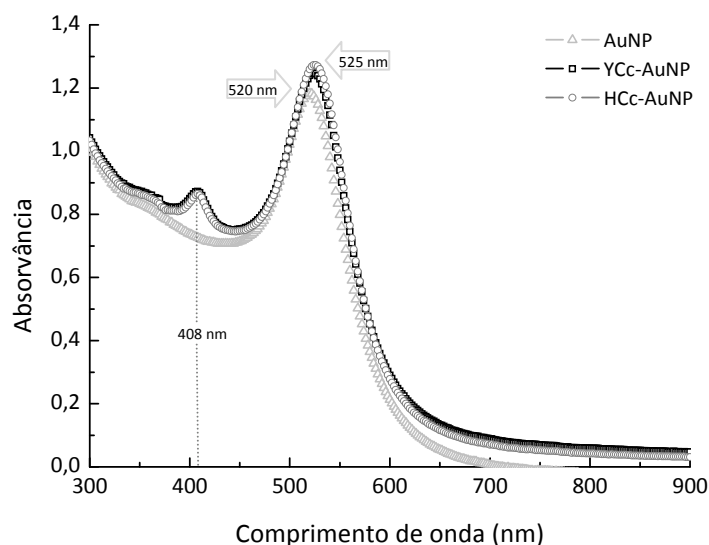


Figura 4.6 Espectros de absorção de UV-visível da solução de AuNP e de ambos os bionanoconjugados à razão de 250 e a pH 11.

4.3.4 Caracterização dos bionanoconjugados por Microscopia de Força Atômica

A AFM foi realizada em amostras secas dos bionanoconjugados HCc-AuNP e YCc-AuNP. O bionanoconjugado YCc-AuNP revela estruturas individuais com um diâmetro médio de $13,9 \pm 2,0$ nm (figura 4.7 a e b), um aumento de cerca de 2,4 nm de diâmetro em relação à solução de AuNP (diâmetro médio de $11,5 \pm 1,7$ nm).

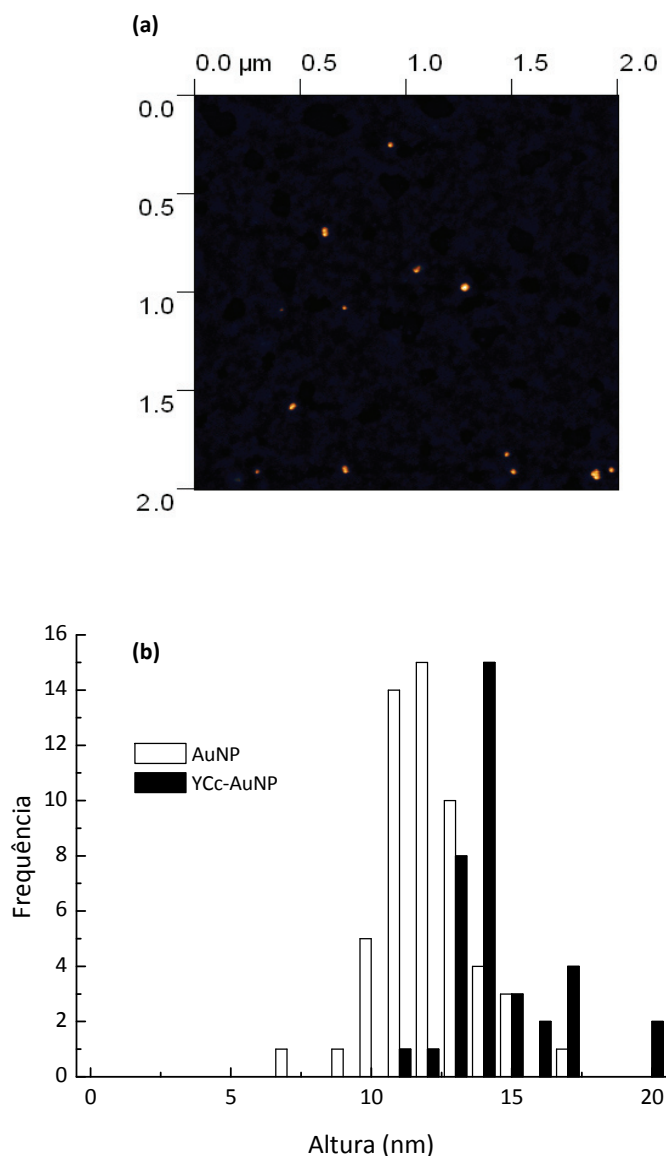


Figura 4.7 (a) Imagem de AFM no modo intermitente do bionanoconjugado YCc-AuNP à razão = 250 e a pH 11 e (b) Histograma de comparação entre as alturas da solução de AuNP (barras brancas) e do bionanoconjugado YCc-AuNP (barras pretas).

A visualização de estruturas com 14 nm de diâmetro indicaram que o YCc está ligado às AuNP, a proteína resistiu à secagem da amostra e formou-se uma camada de proteína. Contrariamente, o HCc-AuNP mostrou maioritariamente partículas pequenas de diâmetro médio = $3,0 \pm 0,4$ nm, e muito poucas partículas maiores que 10 nm. Estas pequenas estruturas provavelmente correspondem ao HCc que se libertou da AuNP, pois o diâmetro medido é concordante com o diâmetro médio determinado por DLS para esta proteína ($2,5 \pm 0,2$ nm).

Estes resultados parecem indicar que os bionanoconjugados HCc-AuNP são instáveis nas condições em que as medidas de AFM foram realizadas, possivelmente a secagem da amostra é responsável pela separação da proteína da AuNP.

4.3.5 Caracterização dos bionanoconjugados por Microscopia Electrónica de Transmissão

O bionanoconjugado YCc-AuNP apresenta partículas esféricas, distribuídas individualmente e de forma homogénea, com um diâmetro médio de $13,6 \pm 2,2$ nm, calculado a partir da contagem de 2094 partículas, como se pode visualizar nas figuras 4.8 e 4.9. Este diâmetro é semelhante ao determinado por TEM para a solução de AuNP sozinha (diâmetro médio de $13,9 \pm 3,3$ nm), o que se deve ao facto desta técnica não distinguir zonas de baixa densidade, isto é, matéria orgânica.

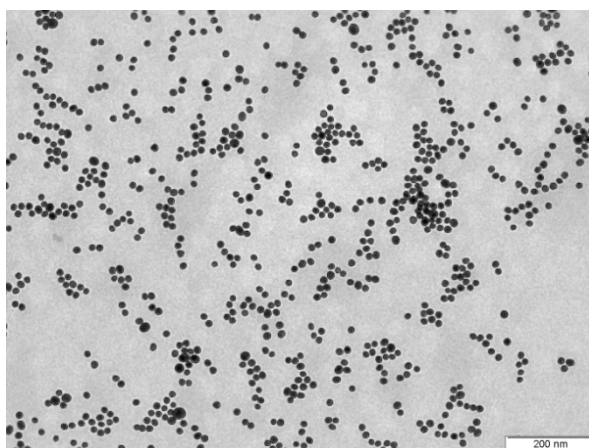


Figura 4.8 Imagem de TEM do bionanoconjugado YCc-AuNP à razão de 250 e a pH 11. A barra de escala corresponde a 200 nm.

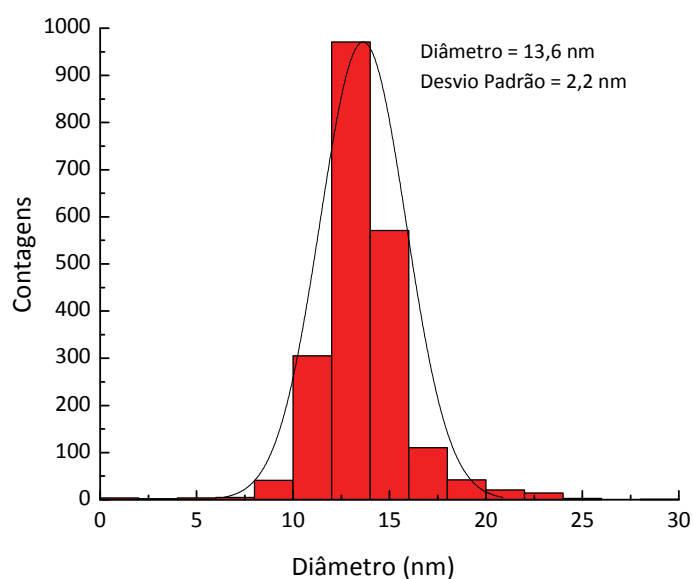


Figura 4.9 Histograma de distribuição de tamanhos da contagem de 2094 YCc-AuNP com diâmetro médio de $13,6 \pm 2,2$ nm.

No que respeita o HCC-AuNP, as imagens de TEM apresentaram um reduzido número de partículas (figura 4.10), não permitindo calcular o valor de diâmetro médio.

A formação dos bionanoconjugados não foi demonstrada por TEM, mas comprovada pelas técnicas anteriores.

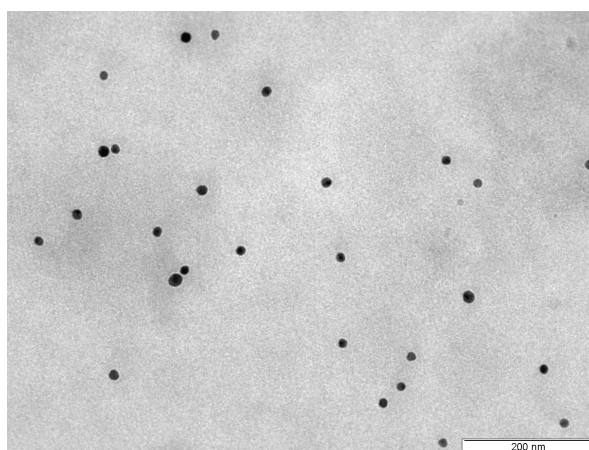


Figura 4.10 Imagem de TEM do bionanoconjugado HCC-AuNP à razão de 250 e a pH 11. A barra de escala corresponde a 200 nm.

4.3.6 Alterações estruturais da proteína nos bionanoconjugados por Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de CD é frequentemente realizada no ultravioleta longínquo para caracterizar a estrutura secundária da proteína em solução e determinar as quantidades relativas dos diferentes elementos da estrutura secundária de uma proteína.

Neste trabalho o CD permitiu avaliar as alterações conformacionais que ocorreram na proteína adsorvida à superfície da AuNP, comparativamente com a proteína em solução.

Os bionanoconjugados à razão = 250 e a solução de proteína à mesma concentração final da razão estudada (concentração final = 3 μ M) foram ajustados a pH 10 e analisados por espectroscopia de CD no ultravioleta longínquo de 195 a 260 nm.

As amostras foram ajustadas a pH 10 uma vez que se verificaram alterações conformacionais a pH 11 no YCc sozinho em solução (diminuição do conteúdo em hélice α e aumento do conteúdo em espiral aleatória), comparativamente com os restantes valores de pH. Apesar de no HCc não se observarem tais alterações conformacionais, o pH 10 foi escolhido em substituição do pH 11 para o ajuste de pH das soluções de proteína e dos bionanoconjugados.

A figura 4.11 ilustra os espectros de CD para ambas as proteínas em solução e na presença da AuNP (bionanoconjugados HCc-AuNP e YCc-AuNP) a pH 10.

No bionanoconjugado HCc-AuNP não se verificam alterações significativas de estrutura secundária do HCc quando adsorvido à AuNP, comparativamente com o HCc em solução. Os espectros de CD (figura 4.11 a) mostram 2 mínimos negativos a 208 e 222 nm, característicos do elevado conteúdo em hélice α do HCc [41].

O mesmo não se verifica com o YCc que sofre alterações consideráveis de estrutura secundária pela interação com a AuNP, o espectro apresenta um mínimo negativo a 204 nm (figura 4.11 b), que não se encontra presente no espectro da proteína em solução.

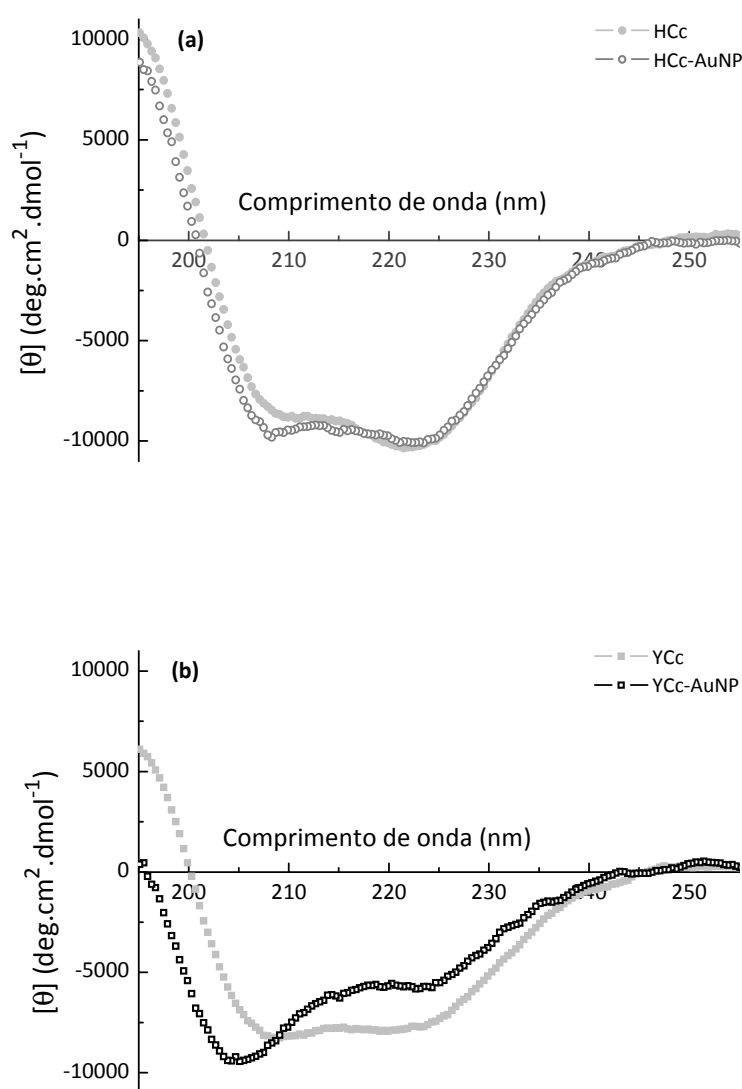


Figura 4.11 (a) Espectros de CD no ultravioleta longínquo do HcC em solução e do bionanoconjugado HcC-AuNP à razão de 250 e a pH 10 e **(b)** Espectros de CD no ultravioleta longínquo do YcC em solução e do bionanoconjugado YcC-AuNP à razão de 250 e a pH 10.

A desconvolução dos espectros através do algoritmo de determinação de estrutura secundária CDSSTR indicou que o HcC em solução a pH 10 apresentou uma conformação em hélice α com um conteúdo de 23%, um conteúdo de 19% em folha β e 40% em espiral aleatória (“random coil”). Quando a proteína adsorve às AuNP, formando o bionanoconjugado, não se verificaram alterações significativas destas conformações.

O YC_c em solução mostrou maioritariamente uma conformação em hélice α com um conteúdo de 31%, 14% em folha β e 38% em espiral aleatória (“random coil”). No bionanoconjugado o conteúdo em folha β praticamente não se alterou, mas diminuiu consideravelmente o conteúdo em hélice α (de 31% em solução para 22% no bionanoconjugado) e aumentou significativamente a conformação em espiral aleatória de 38% em solução para 52% no bionanoconjugado. A diminuição do conteúdo em hélice α e o aumento do conteúdo em espiral aleatória do YC_c após conjugação com a AuNP, relativamente ao YC_c em solução, indicam uma perda de estrutura secundária, não observada no HC_c.

4.4 Discussão de Resultados

No presente capítulo demonstrou-se a formação dos bionanoconjugados HC_c-AuNP e YC_c-AuNP por UV-visível, AFM e medidas de potencial zeta e analisaram-se as características das proteínas adsorvidas às AuNP por CD.

Detectou-se um desvio de 5 nm para o vermelho da banda de SPR das AuNP por espectroscopia de UV-visível, comprovando a formação dos bionanoconjugados com ambos os citocromos. Os resultados de AFM mostraram ligação de YC_c à AuNP pela formação de uma monocamada de proteína com cerca de 2 nm, que não é removida aquando da secagem da amostra. O mesmo não se verificou no caso dos bionanoconjugados com HC_c, em que a proteína possivelmente desadsorve da AuNP quando a amostra é seca.

Apesar da DLS detectar formas agregadas para os bionanoconjugados a partir de razões [Cyt c] / [AuNP] relativamente baixas, foi possível observar um aumento de diâmetro hidrodinâmico de cerca de 12 nm (AuNP sozinhas) para cerca de 19 nm no caso dos bionanoconjugados YC_c-AuNP à razão de 45. Este aumento de d (H) de cerca de 7 nm, que não foi observado para os bionanoconjugados HC_c-AuNP, corresponderá a uma coroa esférica de proteína com cerca de 3,5 nm de raio nos bionanoconjugados YC_c-AuNP, de acordo com os resultados de AFM.

Os resultados de potencial zeta demonstraram a formação de ambos os bionanoconjugados pela perda da carga negativa das AuNP em solução, quando incubadas

com concentrações crescentes de qualquer um dos citocromos *c*, até atingirem uma estabilização; demonstrando a formação de uma camada de proteína à superfície da AuNP, tal como anteriormente verificado por Niemeyer e colaboradores para a ligação de citocromo P450 à superfície de pontos quânticos (“quantum dots”) [36].

Os dados de potencial zeta foram ajustados a uma isotérmica de adsorção de Langmuir, assumindo que a adsorção ocorre via monocamada simples. Para se explicar a formação de bionanoconjugados estáveis com cerca de 200 moléculas de proteína por AuNP, ao passo que a adsorção em uma monocamada assumiria cerca de metade desse valor (consultar apêndice VI), considerou-se que o processo de adsorção excede o limite de empacotamento, implicando que as proteínas apresentem mobilidade lateral significativa, permitindo assim a formação de uma monocamada densa. Esta mobilidade pode ocorrer em HCc que se liga às AuNP por interações electrostáticas, mas em YCc esta mobilidade é reduzida pela ligação covalente à AuNP através do resíduo de cisteína disponível. A diminuição observada do conteúdo em hélice α no YCc do bionanoconjugado poderá ocorrer a fim de possibilitar um empacotamento mais denso da proteína à superfície da AuNP.

A partir dos parâmetros de ajuste da isotérmica de adsorção de Langmuir para ambos os bionanoconjugados (consultar tabela 4.1, secção 4.3.2.2), verificou-se que o valor máximo de potencial zeta é semelhante para ambos os bionanoconjugados, mas que o valor de K_L para o HCc é mais do dobro do valor para o YCc. O produto $\zeta_{\max} \cdot K_L$ está relacionado com alterações de entalpia durante o processo de adsorção, sendo maiores na ligação do HCc à AuNP do que na ligação do YCc às nanopartículas, o que pode ser explicado pelo facto do HCc se ligar à AuNP por interações electrostáticas, enquanto o processo de ligação do YCc ocorre via ligação covalente através da cisteína 102. Como para HCc não se verificam alterações na conformação da proteína ligada (tal como determinado por CD), existe apenas a possibilidade de poderem estar envolvidos outros factores como por exemplo, factores entrópicos.

A associação proteína-nanopartícula pode ser um processo controlado por factores entrópicos, com libertação de um grande número de moléculas de água e/ou contra-íões. A libertação de moléculas de água (provenientes da desidratação de partes da molécula de proteína, da AuNP, ou de ambas) é frequentemente o factor de ligação mais importante entre proteínas e a superfície das AuNP, e assim durante o processo de formação dos bionanoconjugados ocorreriam alterações mínimas na conformação da proteína

concomitantemente com o aumento da entropia do sistema, tal como proposto por Dawson e colaboradores [42].

Considerando que na adsorção à AuNP, a proteína retém a sua conformação nativa e activa, a libertação de moléculas de água poderá constituir a força motriz para a ligação da proteína à superfície da AuNP e não a energia associada a alterações na conformação da proteína.

Com o objectivo de se desenvolver um modelo estrutural para a interacção do Cyt c com a AuNP, foi analisado o potencial de superfície electrostático das estruturas tridimensionais (3D) de raios-X dos citocromos. A figura 4.12 ilustra a superfície que está mais provavelmente em contacto com as AuNP e a superfície oposta, que é a face exposta à solução, quando a proteína está ligada à AuNP.

Para o HCc a superfície seleccionada para contacto com as AuNP é a face rica em lisinas [27], e para o YCc a superfície escolhida para interagir com a AuNP é a face onde está presente o resíduo de cisteína 102, estando a face oposta de ambos os citocromos em contacto com a solução. A figura 4.12 mostra que para o HCc a face que está em contacto com a AuNP apresenta um potencial de superfície extremamente positivo (as zonas azuis correspondem aos potenciais positivos), e a face que está em contacto com a solução uma carga menos positiva. O YCc apresenta resíduos de carga neutra e negativos (as zonas representadas a vermelho correspondem aos potenciais negativos e a branco aos potenciais neutros) em torno da cisteína 102 (representada pela seta) na face que está em contacto com a AuNP, e na face oposta uma carga mais positiva. A interacção “forçada” do YCc através da ligação covalente à carga negativa das AuNP, tem sido considerada como a responsável pela destabilização da estrutura secundária da proteína [43]. Esta destabilização poderá explicar a diminuição do conteúdo em hélice α observada para o YCc no bionanoconjugado, comparativamente com o respectivo conteúdo em solução, como verificado por CD. Ocorreu uma diminuição de 9% em hélice α e um aumento de 14% em espiral aleatória (“random coil”), o que indicou uma perda da estrutura secundária nativa do YCc no bionanoconjugado. Resultados semelhantes estão descritos na literatura [7, 44]. A carga positiva existente na face exposta para a solução de ambas as proteínas pode ser responsável pelo aumento de potencial zeta observado nos bionanoconjugados com diferentes razões [Cyt c] / [AuNP].

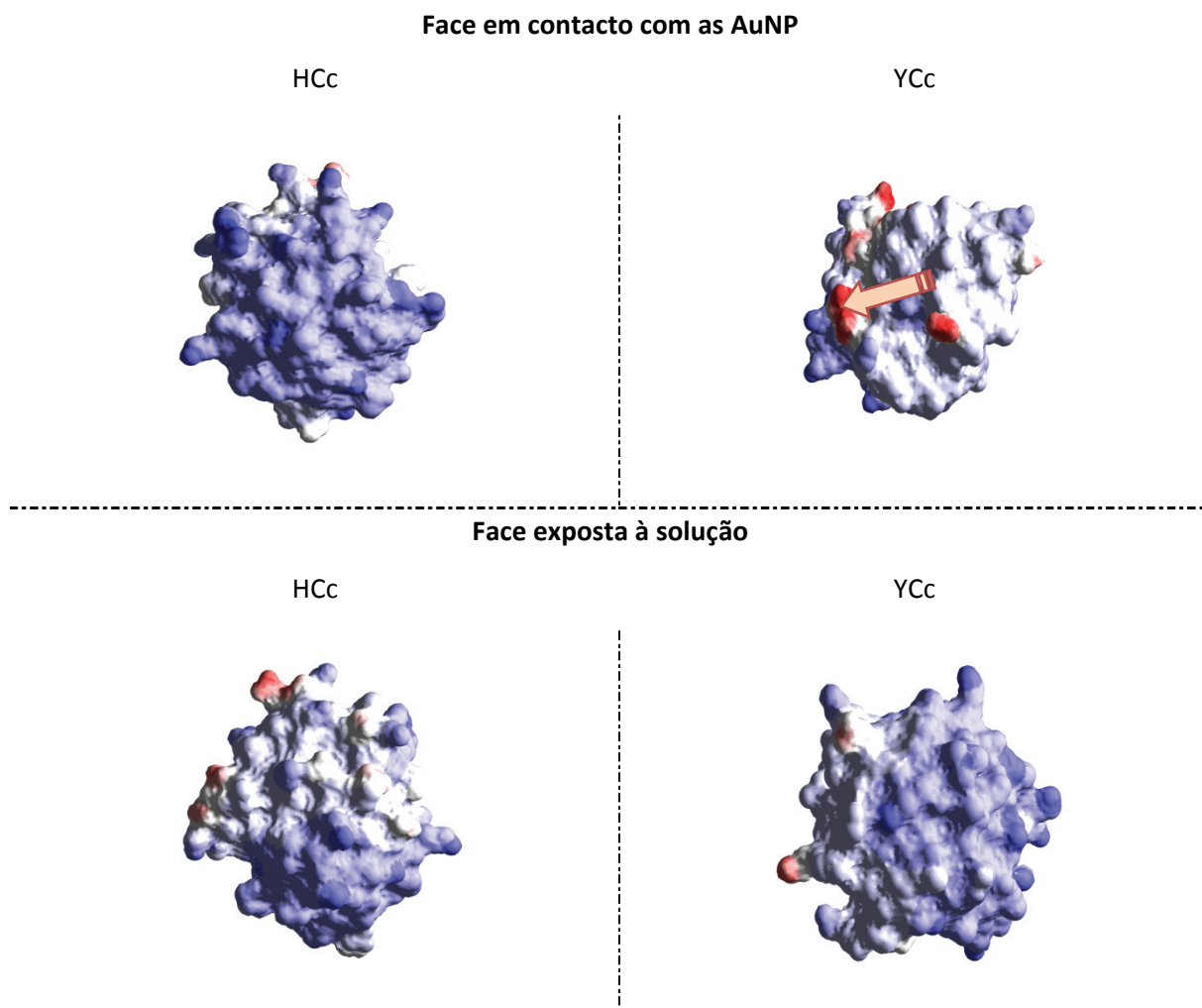


Figura 4.12 Potenciais electrostáticos de superfície da estrutura 3D de raios-X dos citocromos HCc (código de acesso PDB: 1HRC) e YCc (código de acesso PDB: 1YCC), exibindo a face que está mais provavelmente em contacto directo com as AuNP e a face oposta, que está mais provavelmente exposta à solução. A seta representa a localização da cisteína 102. As zonas representadas a vermelho correspondem aos potenciais negativos e a azul aos potenciais positivos, num intervalo de potenciais de -2 a 12 KTe^{-1} . As figuras foram preparadas usando o utilitário Swiss-Pdb Viewer 3.7.

4.5 Conclusões

Neste trabalho foi demonstrada a formação de bionanoconjugados constituídos pela adsorção de HCc ou YCc a AuNP e analisaram-se as suas características de superfície.

O desvio de 5 nm observado na banda de SPR em relação à AuNP em solução, a formação de uma camada de proteína de cerca de 2 nm em torno da AuNP no

bionanoconjugado YCc-AuNP, e um potencial zeta uniforme correspondente a cerca de 200 moléculas de proteína por AuNP, são evidências da formação dos bionanoconjugados.

Os dois citocromos apresentam uma sequência de aminoácidos semelhante, mas formam bionanoconjugados com propriedades de superfície distintas em termos de potenciais de superfície. Tal diferença pode ser explicada pelo facto de ambas as proteínas interagirem com a AuNP de forma diferente: HCc interage com a AuNP por interacções electrostáticas, enquanto que YCc interage com a nanopartícula através de uma ligação covalente. Esta ligação covalente é provavelmente responsável pela destabilização da estrutura secundária nativa do YCc no bionanoconjugado conferindo-lhe diferentes propriedades de superfície, comparativamente com o bionanoconjugado HCc-AuNP.

Em conclusão, este trabalho de investigação mostra que é possível formar bionanoconjugados Cyt c-AuNP em que a proteína apresenta propriedades de superfície distintas da sua forma em solução.

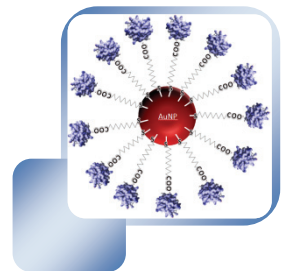
4.6 Bibliografia

- [1] You, C.-C.; Verma, A.; Rotello, V. M. *Soft Matter* **2006**, 2, 190-204.
- [2] Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 943-950.
- [3] Brewer, S. H.; Glomm, W. R.; Johnson, M. C.; Knag, M. K.; Franzen, S. *Langmuir* **2005**, 21, 9303-9307.
- [4] Chah, S.; Hammond, M. R.; Zare, R. N. *Chemistry & Biology* **2005**, 12, 323-328.
- [5] Jiang, X.; Jiang, U. G.; Jin, Y. D.; Wang, E. K.; Dong, S. J. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 46-53.
- [6] Keating, C. D.; Kovalski, K. M.; Natan, M. J. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 9404-9413.
- [7] Shang, L.; Wang, Y. Z.; Jiang, J. G.; Dong, S. J. *Langmuir* **2007**, 23, 2714-2721.
- [8] Phillips, R. L.; Miranda, O. R.; You, C. C.; Rotello, V. M.; Bunz, U. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2590-2594.
- [9] You, C.-C.; Miranda, O. R.; Gider, B.; Ghosh, P. S.; Kim, I.-B.; Erdogan, B.; Krovi, S. A.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 318-323.
- [10] You, C. C.; De, M.; Rotello, V. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 639-646.

- [11] Lindman, S.; Lynch, I.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 914-920.
- [12] Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55-75.
- [13] Eustis, S.; El-Sayed, M. A. *Chem Soc. Rev.* **2006**, *35*, 209-217.
- [14] Perez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzan, L. M.; Mulvaney, P. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1870-1901.
- [15] Sonnichsen, C.; Reinhard, B. M.; Liphardt, J.; Alivisatos, A. P. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 741-745.
- [16] Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238-7248.
- [17] Khlebtsov, N. G.; Trachuk, L. A.; Mel'nikov, A. G. *Opt. Spectrosc.* **2005**, *98*, 77-83.
- [18] Lee, K. S.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20331-20338.
- [19] Scott, R. A.; Mauk, A. G. *Cytochrome c: A multidisciplinary approach*; University Science Books: Sausalito, CA, 1995.
- [20] Kluck, R. M.; BossyWetzel, E.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D. *Science* **1997**, *275*, 1132-1136.
- [21] Kluck, R. M.; Martin, S. J.; Hoffman, B. M.; Zhou, J. S.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D. *EMBO Journal* **1997**, *16*, 4639-4649.
- [22] Sanghera, N.; Pinheiro, T. J. *Protein Science* **2000**, *9*, 1194-1202.
- [23] Heering, H. A.; Wiertz, F. G. M.; Dekker, C.; de Vries, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11103-11112.
- [24] Bortolotti, C. A.; Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Facci, P.; Ranieri, A.; Sola, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5444-5451.
- [25] Bonanni, B.; Alliata, D.; Bizzarri, A. R.; Cannistraro, S. *Chemphyschem* **2003**, *4*, 1183-1188.
- [26] Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673-4680.
- [27] Banci, L.; Bertini, I.; Rosato, A.; Varani, G. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 824-837.
- [28] Rieder, R.; Bosshard, H. R. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 4732-4739.
- [29] Gomes, I.; Santos, N. C.; Oliveira, L. M. A.; Quintas, A.; Eaton, P.; Pereira, E.; Franco, R. J. *Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 16340-16347.
- [30] Lee, P. C.; Meisel, D. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391-3395.
- [31] Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, 668-673.

- [32] Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Biopolymers* **2008**, *89*, 392-400.
- [33] Provencher, S. W. *Comput. Phys. Commun.* **1982a**, *27*, 213-227.
- [34] Provencher, S. W. *Comput. Phys. Commun.* **1982b**, *27*, 229-242.
- [35] Nath, N.; Chilkoti, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8197-8202.
- [36] Ipe, B. I.; Shukla, A.; Lu, H. C.; Zou, B.; Rehage, H.; Niemeyer, C. M. *Chemphyschem* **2006**, *7*, 1112-1118.
- [37] Rezwan, K.; Studart, A. R.; Voros, J.; Gauckler, L. J. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14469-14474.
- [38] Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. In *The Proteomics Protocols Handbook*; Walker, J. M.; Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005.
- [39] Kaufman, E. D.; Belyea, J.; Johnson, M. C.; Nicholson, Z. M.; Ricks, J. L.; Shah, P. K.; Bayless, M.; Pettersson, T.; Feldoto, Z.; Blomberg, E.; Claesson, P.; Franzen, S. *Langmuir* **2007**, *23*, 6053-6062.
- [40] Figueiredo, J. L.; Ribeiro, F. R. *Catálise Heterogénea*; Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 2007.
- [41] Drake, A. F. *Protein-Ligand Interactions: structure and spectroscopy*; Harding, S. E.; Chowdhry, B. Z.; Eds.; Oxford University Press Inc., New York, 2001.
- [42] Dawson, K. A.; Linse, S.; Lynch, I. *E-Nano Newsletter* **2007**, *10*, 23-34.
- [43] Aubin-Tam, M. E.; Hamad-Schifferli, K. *Langmuir* **2005**, *21*, 12080-12084.
- [44] Srivastava, S.; Verma, A.; Frankamp, B. L.; Rotello, V. M. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 617-621.

CAPÍTULO 5. FORMAÇÃO DE BIONANOCONJUGADOS CITOCROMO C - NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS



5.1 Introdução

As nanopartículas de ouro para além das suas propriedades ópticas únicas, robustez e elevada área de superfície, podem ser funcionalizadas com ligandos tiolados, apresentando na extremidade oposta funcionalidades aniónica, catiónica, hidrofóbica, etc; formando uma monocamada que interage especificamente com biomoléculas [1, 2].

No capítulo 4 foi demonstrada a formação dos bionanoconjugados HCc-AuNP e YCc-AuNP sendo as AuNP revestidas com citrato de sódio. Este agente de revestimento pode ser substituído por um tiol como por exemplo o ácido mercaptoundecanóico (MUA), frequentemente descrito na literatura [1, 3, 4]. Este alcanotiol no substrato de ouro permite a formação de superfícies bem definidas com funcionalidades químicas controladas [1].

Neste capítulo descreve-se a formação dos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP, pela interacção do citocromo c de coração de cavalo com nanopartículas de ouro revestidas com ácido mercaptoundecanóico (MUA-AuNP), demonstrada por medidas de potencial zeta, espectroscopia de UV-visível e microscopia de força atómica. Não foi estudada a interacção entre o YCc e a MUA-AuNP para formação de um bionanoconjugado, devido ao facto do YCc se ligar covalentemente através do resíduo de cisteína 102 à superfície do ouro [5-7] e sofrer alterações de estrutura secundária na presença das AuNP, como apresentado no capítulo anterior.

O ácido mercaptoundecanóico forma uma monocamada à superfície das AuNP apresentando uma terminação carboxilato (COO^-). Esta monocamada favorece a interacção electrostática entre a proteína e a superfície da AuNP e pode proporcionar informação acerca do processo de transferência electrónica [8, 9]. O MUA liga-se à superfície do ouro através da ligação covalente, pela terminação $-\text{SH}$ [10, 11] e interage com o HCc através do terminal COO^- de forma electrostática, através da formação de pontes salinas com os grupos de lisinas da proteína [9], como ilustra a figura 5.1. Um estudo semelhante foi desenvolvido por Rotello e colaboradores relativamente à formação de monocamadas mistas contendo terminais aniónicos protectoras das nanopartículas para reconhecimento da superfície e inibição da actividade da alfa-quimiotripsina (ChT); este estudo revelou que as AuNP interagem com a ChT através de dois passos: uma rápida inibição reversível, seguido de um processo lento e irreversível que conduz à desnaturação da ChT à superfície da monocamada da AuNP [12, 13].

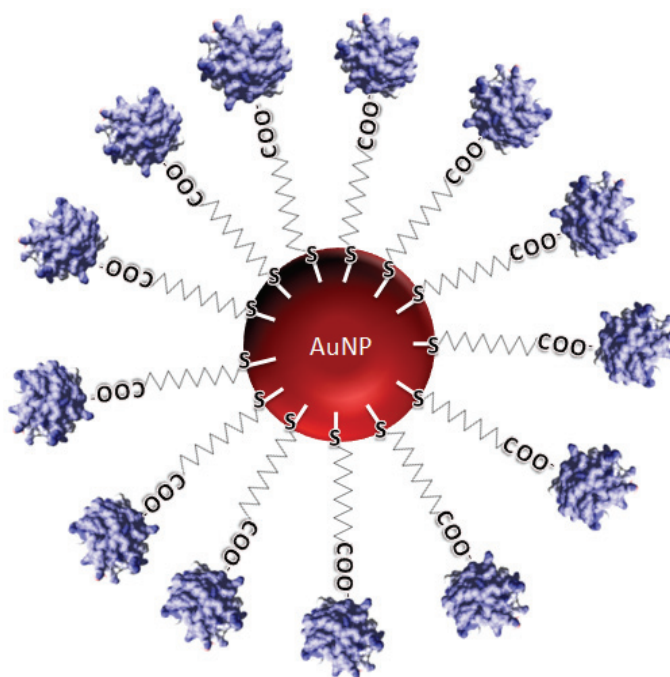


Figura 5.1 Representação esquemática do bionanoconjugado HCC-MUA-AuNP.

A interação da proteína com as nanopartículas funcionalizadas conduziu a uma alteração do índice de refração do meio que envolve a nanopartícula, alterando a distância inter-partícula e provocando um desvio para o vermelho de 2 nm da banda de ressonância plasmônica superficial (a posição da banda de SPR para uma partícula esférica depende do índice de refração do meio envolvente [14-16]), o que demonstrou a formação dos bionanoconjugados, também comprovada por medidas de potencial zeta.

5.2 Procedimento Experimental

5.2.1 Preparação das nanopartículas de ouro funcionalizadas e dos bionanoconjugados

As nanopartículas de ouro funcionalizadas com ácido 11-mercaptoundecanóico, MUA, ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$, grau de pureza de 95%, Sigma-Aldrich), foram preparadas segundo o procedimento seguinte:

A solução de AuNP foi sintetizada pelo método de redução de citrato de sódio [17], como apresentado em apêndice IV e seguidamente a solução de MUA-AuNP foi preparada

pela adição de um volume de uma solução de MUA em etanol absoluto (grau de pureza de 99,8%, Riedel-de-Haën) numa concentração de 3,1 mM, de forma a corresponder a uma razão molar final de $[MUA] / [AuNP] = 120$. A adição foi efectuada à temperatura ambiente e sob agitação magnética³.

A concentração das nanopartículas de ouro funcionalizadas foi determinada pela lei de Lambert-Beer, assumindo que a absorvidade molar calculada para a banda de ressonância plasmónica superficial a 526 nm é de $2,33 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [18]. A concentração das MUA-AuNP obtida através deste método situa-se entre os 11 - 13 nM. A solução de MUA-AuNP foi diluída em água ultra-pura (Milli-Q, Millipore, 18,2 MΩ.cm) para se obterem concentrações inferiores à concentração determinada após a síntese. Apresentou um máximo de comprimento de onda na banda de SPR de cerca de 523 nm, exibiu cor vermelho escuro e um pH ligeiramente ácido.

Os bionanoconjugados foram preparados pela incubação durante a noite da solução de MUA-AuNP, ajustada a pH 11 pela adição da solução de NaOH 0,1 M, com a quantidade apropriada da solução de citocromo c, para se obterem os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP com a razão $[HCc] / [MUA-AuNP]$ desejada.

A solução de HCc foi preparada como descrito no apêndice V.

5.2.2 Medidas de Espectroscopia e Microscopia

Foram realizadas medidas espectroscópicas e microscópicas utilizando espectroscopia de UV-visível e microscopia de força atómica. Os procedimentos experimentais foram os mesmos dos descritos no capítulo 4 em 4.2.2.1 e 4.2.2.3, sendo as amostras estudadas a solução MUA-AuNP e os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP ao mesmo pH e concentração.

³ A autora agradece ao Dr. Pedro Quaresma pela preparação da solução de MUA-AuNP.

5.2.3 Medidas de Dispersão de Luz

As medidas de dispersão de luz dinâmica e de potencial zeta foram efectuadas segundo o procedimento descrito no capítulo 4 em 4.2.3.1 e 4.2.3.2, mantendo-se a mesma concentração e pH nas amostras MUA-AuNP e bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP.

Os resultados de potencial zeta obtidos para as diferentes razões [HCc] / [MUA-AuNP] foram ajustados a uma isotérmica de adsorção de Langmuir através do utilitário Origin Pro 8.0.

5.3 Resultados

5.3.1 Caracterização das nanopartículas de ouro funcionalizadas

A solução de MUA-AuNP a pH 11 apresentou cor vermelha e uma banda de SPR a 523 nm determinada por espectroscopia de UV-visível, como ilustra a figura 5.2.

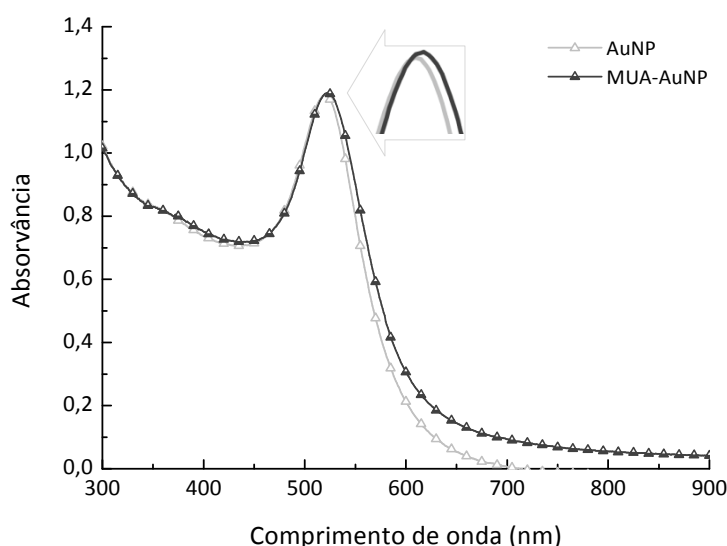


Figura 5.2 Espectros de absorção de UV-visível da solução de AuNP e de MUA-AuNP a pH 11.

Verifica-se um ligeiro desvio para um comprimento de onda maior, comparativamente com a banda de SPR da solução de AuNP (máximo a 520 nm), devido ao

facto do MUA estar ligado à superfície da AuNP, o que conduz a alterações na constante dielétrica do meu envolvente (o índice de refração do meio está directamente relacionado com a constante dielétrica) [19-21]. A variação observada (3 nm) não é contudo muito significativa dado que o erro associado à medição é de ± 2 nm.

As AuNP funcionalizadas revelam por AFM estruturas individuais com uma coroa orgânica em redor da AuNP, como evidenciado na figura 5.3, sendo o diâmetro médio determinado de $14,0 \pm 2,0$ nm, que é concordante com o valor de d (H) obtido por DLS de $13,5 \pm 1,5$ nm.

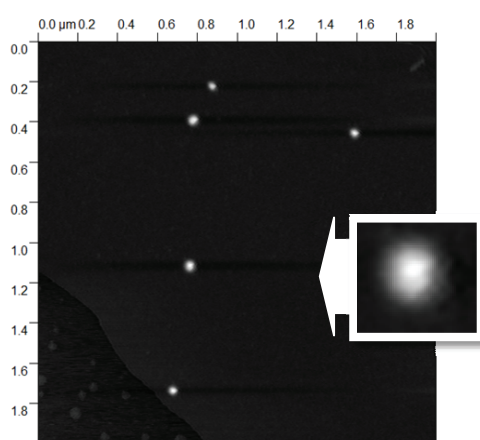


Figura 5.3 Imagem de AFM no modo intermitente de AuNP funcionalizadas com MUA.

Verificou-se um aumento de diâmetro de cerca de 3,8 nm, comparativamente com a solução de AuNP não funcionalizadas, analisada por AFM no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais, para a qual se determinou um diâmetro médio de $10,2 \pm 0,9$ nm a partir da contagem de nanopartículas individuais, como destacado na figura 5.4.

Observou-se também um aumento de cerca de 1,8 nm de diâmetro relativamente à solução de AuNP (d (H) = $11,7 \pm 1,6$ nm) determinado por DLS. Estes resultados demonstram a formação da monocamada MUA-AuNP.

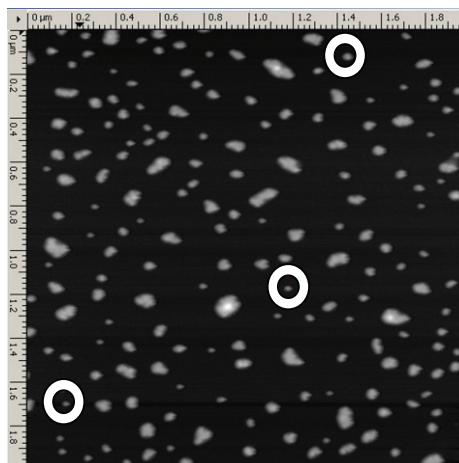


Figura 5.4 Imagem de AFM no modo intermitente de AuNP não funcionalizadas.

A ligação do MUA à superfície da AuNP foi também confirmada por espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP). As amostras analisadas por ICP foram preparadas como descrito no apêndice VII.

A análise por ICP mostrou para a solução de MUA-AuNP uma concentração de enxofre de 0,023 mg/L, comparativamente com a solução de AuNP que não possui este elemento (concentração de enxofre = 0,000 mg/L), o que confirma que o MUA está presente na amostra. Dada a elevada afinidade do enxofre pelo ouro, é muito provável que a extremidade tiolada do ligando que contém enxofre esteja de facto ligada à superfície da AuNP.

5.3.2 Avaliação da superfície de revestimento dos bionanoconjugados

A formação dos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP foi confirmada pelas medidas de potencial zeta, dado que através desta técnica foi possível medir a variação da carga apresentada pela superfície do bionanoconjugado com o aumento da razão $[HCc] / [MUA-AuNP]$.

A solução de MUA-AuNP e dos bionanoconjugados foi preparada como descrito no procedimento experimental, em que se incubaram concentrações crescentes do HCc para uma mesma concentração de MUA-AuNP, formando-se bionanoconjugados com diferentes razões, até a uma razão máxima $[HCc] / [MUA-AuNP]$ de 500.

O potencial zeta medido para a solução MUA-AuNP foi $-49,8 \pm 1,5$ mV, semelhante ao descrito na literatura [3].

Para os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP, o potencial zeta aumenta muito rapidamente até à razão $[HCc] / [MUA-AuNP]$ de 100, apresentando um valor de potencial de $-29,7 \pm 1,2$ mV. Valores de potencial zeta semelhantes a este foram medidos nas razões mais elevadas, como mostra a figura 5.5.

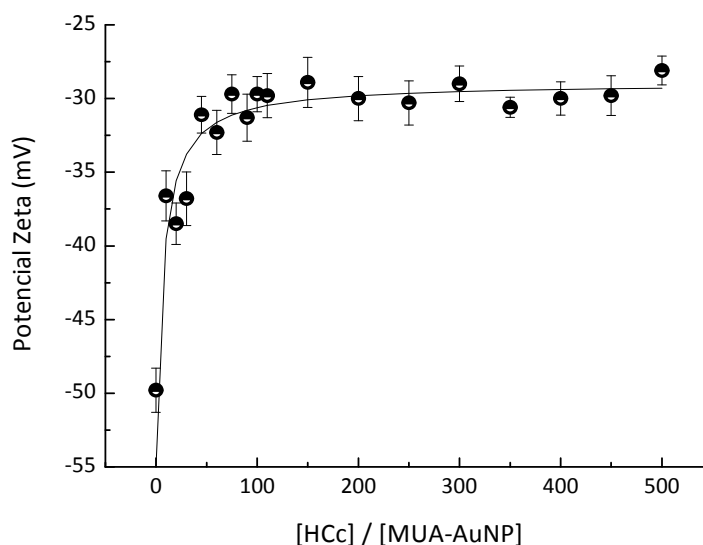


Figura 5.5 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP em função da razão $[HCc] / [MUA-AuNP]$ a pH 11. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio. A linha preta representa o ajuste a uma isotérmica de adsorção de Langmuir.

Nos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP o potencial zeta vai sendo cada vez menos negativo à medida que a razão aumenta, até que atinge um patamar, em que o potencial zeta estabiliza em torno de -30 mV, o que corresponde a uma cobertura uniforme da MUA-AuNP pela proteína.

O número de moléculas de HCc que teoricamente se podem ligar às MUA-AuNP recobrando-as completamente, foi determinado assumindo um empacotamento cúbico de face centrada como descrito no apêndice VI.

Numa primeira monocamada podem adsorver 92 moléculas de HCc e numa segunda monocamada 172 moléculas de proteína por MUA-AuNP, o que mostra que a

estabilização dos valores de potencial zeta em cerca de 100 moléculas de proteína por MUA-AuNP ocorre logo numa primeira monocamada formada. A fim de garantir um recobrimento total das AuNP funcionalizadas, pelo HCc, foram preparados bionanoconjugados com uma razão $[HCc] / [MUA-AuNP] = 150$.

Como a adsorção ocorre numa única monocamada, os pontos experimentais foram ajustados a uma isotérmica de adsorção de Langmuir [3, 22], sendo os parâmetros obtidos para o ajuste dos dados experimentais apresentados na tabela 5.1, através da equação 1 (Origin Pro 8.0).

$$\zeta = \frac{\zeta_{\max} K_L R}{1 + K_L R} \quad (1)$$

ζ é o ζ -potencial medido para o bionanoconjugado com a superfície de cobertura $R = [Cyt\ c] / [AuNP]$, $\zeta_{\max}$ é o valor máximo de ζ -potencial e K_L é a constante de ligação, que corresponde ao valor do inverso das razões de concentração ($1/R$), para metade do $\zeta_{\max}$.

Tabela 5.1 Parâmetros de ajuste da isotérmica de adsorção de Langmuir para os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP.

	$\zeta_{\max}$ (mV)	K_L	$\zeta_{\max} \cdot K_L$ (mV)
HCc-MUA-AuNP	$-28,9 \pm 0,72$	$0,145 \pm 0,037$	-4,19

5.3.3 Caracterização do bionanoconjugado por Espectroscopia de UV-visível

O bionanoconjugado HCc-MUA-AuNP foi preparado à razão de 150 e a pH 11 (o HCc de concentração final $0,74\ \mu\text{M}$ foi incubado durante a noite numa solução de MUA-AuNP com uma concentração final de $5\ \text{nM}$). Esta solução apresenta cor vermelha, uma banda de SPR com um comprimento máximo de $525\ \text{nm}$ e uma banda de Soret a $408\ \text{nm}$, como ilustra a figura 5.6. Verifica-se um desvio para o vermelho de $2\ \text{nm}$ em comparação com a banda de SPR a $523\ \text{nm}$ característica da solução de MUA-AuNP. Este desvio corresponde a alterações no índice de refração do MUA-AuNP pela presença do HCc, e está dentro do erro associado à medição ($\pm 2\ \text{nm}$).

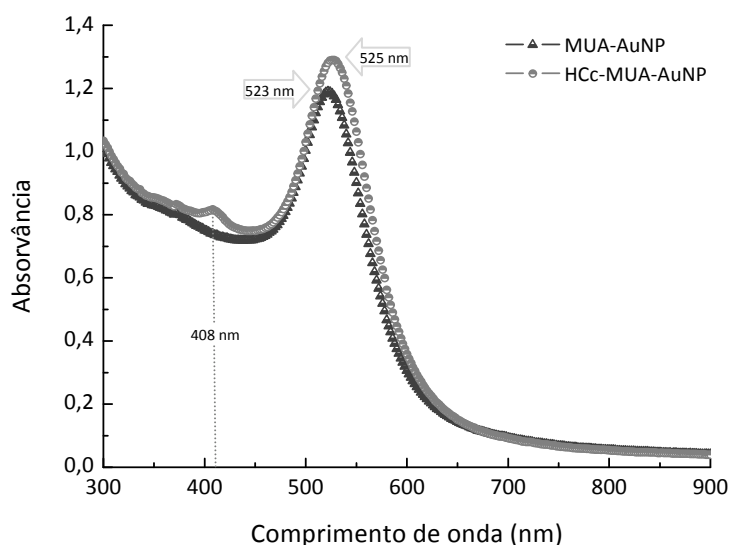


Figura 5.6 Espectros de absorção de UV-visível da solução de MUA-AuNP e do bionanoconjugado HCC-MUA-AuNP à razão de 150 e a pH 11.

5.3.4 Caracterização do bionanoconjugado por Microscopia de Força Atômica

O bionanoconjugado HCC-MUA-AuNP apresentou maioritariamente moléculas de proteína individuais de diâmetro reduzido, o que demonstra que a proteína se libertou do MUA-AuNP. Possivelmente a secagem da amostra efectuada antes da análise por AFM é responsável pela separação do HCC do MUA-AuNP, formando-se bionanoconjugados pouco estáveis. O mesmo foi verificado anteriormente aquando da formação do bionanoconjugado HCC-AuNP.

5.4 Discussão de Resultados

A formação do bionanoconjugado HCC-MUA-AuNP foi comprovada por espectroscopia de UV-visível e por medidas de potencial zeta.

Pela espectroscopia de UV-visível verificou-se um desvio de 2 nm para o vermelho da banda de SPR das MUA-AuNP aquando da formação do bionanoconjugado, sendo esse desvio de 5 nm se compararmos a posição da banda de SPR nas AuNP revestidas com citrato

(antes da formação da monocamada de MUA) com a posição da banda de SPR nos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP. Este desvio corresponde a alterações no índice de refração das AuNP pela presença da monocamada orgânica assim como do revestimento com proteína. A posição da banda de SPR a 525 nm foi observada para ambos os bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP e HCC-AuNP, o que parece reflectir que o tipo de estrutura em torno das AuNP é semelhante.

As medidas de potencial zeta mostraram uma diminuição da carga negativa dos MUA-AuNP em solução ($-49,8 \pm 1,5$ mV) com o aumento da razão [HCC] / [MUA-AuNP], até que o potencial zeta estabiliza a partir da razão = 100 moléculas de proteína por MUA-AuNP, de acordo com o valor teórico calculado para uma monocamada (92 moléculas de citocromo c), o que comprova que a proteína recobre a superfície da AuNP funcionalizada numa única monocamada.

Comparativamente com os resultados de potencial zeta obtidos no capítulo anterior relativamente à formação dos bionanoconjugados HCC-AuNP, verificou-se que os valores de potencial zeta aumentam mais acentuadamente com o aumento da quantidade de proteína presente para os bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP e estabilizam em valores próximos dos determinados para o HCC-AuNP, como mostra a figura 5.7.

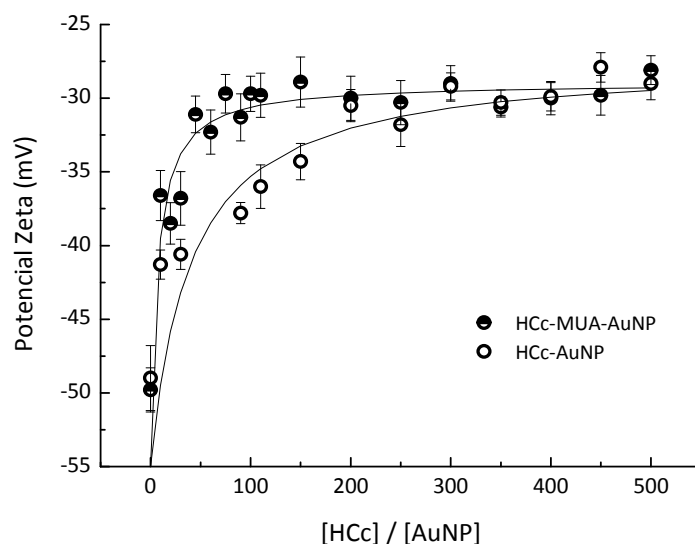


Figura 5.7 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP e HCC-AuNP, em função da razão [HCC] / [MUA-AuNP] e [HCC] / [AuNP] a pH 11. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio.

A estabilização dos valores de potencial zeta para o bionanoconjugado HCc-MUA-AuNP ocorreu a uma razão $[HCc] / [MUA-AuNP]$ de 100, uma razão inferior à observada para o bionanoconjugado HCc-AuNP (razão $[HCc] / [AuNP] = 200$), o que demonstra que as MUA-AuNP estão totalmente recobertas com a proteína numa monocamada simples ao contrário da monocamada densa presente no bionanoconjugado HCc-AuNP.

Comparando o ajuste dos pontos experimentais a uma isotérmica de adsorção de Langmuir para ambos os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP e HCc-AuNP (tabela 5.2), verifica-se que o $\zeta_{\max}$ determinado para os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP é próximo do obtido para o HCc-AuNP. O valor de K_L para o HCc-MUA-AuNP é mais do quántuplo do valor determinado para o HCc-AuNP, o que mostra que a constante de ligação é favorecida pela presença da monocamada de MUA à superfície da AuNP. O produto $\zeta_{\max} \cdot K_L$ está relacionado com alterações de entalpia, que são cerca de seis vezes superiores no bionanoconjugado HCc-MUA-AuNP em comparação com o HCc-AuNP.

Esta diferença significativa em termos de alterações de entalpia, tendo em conta que a ligação de HCc à superfície das nanopartículas ocorre principalmente através de interações electrostáticas, poderá ser explicada por uma maior densidade de carga (e possivelmente uma distribuição de carga mais homogénea) apresentada pela monocamada de MUA comparativamente com o revestimento com citrato apresentado pelas AuNP não funcionalizadas. Em ambos os casos, para além das alterações de entalpia, também o factor entropia está presente, uma vez que a ligação da proteína às nanopartículas funcionalizadas ou não funcionalizadas, é também influenciada pelo aumento de entropia que acompanha a libertação das moléculas de água que constituem a camada de hidratação da nanopartícula [8, 23].

Tabela 5.2 Parâmetros de ajuste da isotérmica de adsorção de Langmuir para os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP e HCc-AuNP.

	$\zeta_{\max}$ (mV)	K_L	$\zeta_{\max} \cdot K_L$ (mV)
HCc-MUA-AuNP	$-28,9 \pm 0,72$	$0,145 \pm 0,037$	-4,19
HCc-AuNP	$-27,4 \pm 2,4$	$0,025 \pm 0,010$	-0,69

Os potenciais electrostáticos de superfície da estrutura tridimensional de raios-X do HCc (figura 4.12 apresentada no capítulo anterior) sugeriram que a face que está em contacto com a terminação carboxilato é a face rica em lisinas com um potencial de superfície extremamente positivo, ao passo que a face exposta à solução apresenta uma carga menos positiva, provavelmente responsável pelo aumento dos valores de potencial zeta do bionanoconjugado HCc-MUA-AuNP à medida que a superfície de cobertura vai sendo maior.

5.5 Conclusões

No presente capítulo foi comprovada a formação do bionanoconjugado HCc-MUA-AuNP, por espectroscopia de UV-visível e medidas de potencial zeta.

Verificou-se que a banda de SPR do bionanoconjugado apresenta um máximo de comprimento de onda que está desviado para o vermelho 2 nm relativamente à banda de SPR da MUA-AuNP em solução e 5 nm relativamente à banda de SPR das AuNP não funcionalizadas.

As medidas de potencial zeta mostraram um potencial de superfície estável para uma proporção de cerca de 100 moléculas de HCc por nanopartícula de ouro funcionalizada, formando assim uma monocamada simples que recobre a superfície da MUA-AuNP.

Os bionanoconjugados formados entre HCc e a AuNP funcionalizada com uma monocamada de MUA apresentam valores de entalpia e de constante de equilíbrio associados ao processo de ligação da proteína, que são cerca de uma ordem de grandeza superior aos observados para o bionanoconjugado HCc-AuNP estudado no capítulo anterior. Tal parece reflectir um modo de interacção electrostática mais eficaz entre os MUA e a proteína relativamente à superfície de citrato apresentada pelas AuNP não funcionalizadas, e indicia a funcionalização como uma estratégia eficaz para a obtenção de bionanoconjugados proteína/AuNP mais estáveis e robustos.

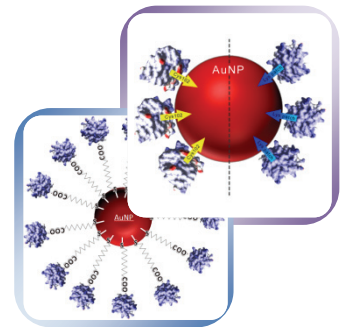
5.6 Bibliografia

- [1] Du, D.; Ding, J.; Cai, J.; Zhang, J.; Liu, L. *Talanta* **2008**, *74*, 1337-1343.
- [2] Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 943-950.
- [3] Kaufman, E. D.; Belyea, J.; Johnson, M. C.; Nicholson, Z. M.; Ricks, J. L.; Shah, P. K.; Bayless, M.; Pettersson, T.; Feldoto, Z.; Blomberg, E.; Claesson, P.; Franzen, S. *Langmuir* **2007**, *23*, 6053-6062.
- [4] Dougherty, G. M.; Rose, K. A.; Tok, B.-H. J.; Pannu, S. S.; Chuang, F. Y. S.; Sha, M. Y.; Chakarova, G.; Penn, S. G. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1131-1139.
- [5] Heering, H. A.; Wiertz, F. G. M.; Dekker, C.; de Vries, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11103-11112.
- [6] Bortolotti, C. A.; Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Facci, P.; Ranieri, A.; Sola, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5444-5451.
- [7] Bonanni, B.; Alliata, D.; Bizzarri, A. R.; Cannistraro, S. *Chemphyschem* **2003**, *4*, 1183-1188.
- [8] Lynch, I.; Dawson, K. A. *nanotoday* **2008**, *3*, 40-47.
- [9] Davis, K. L.; Drews, B. J.; Yue, H.; Waldeck, D. H. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 6571-6576.
- [10] Lévy, R. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1141-1145.
- [11] Bhattacharya, R.; Patra, C. R.; Wang, S.; Lu, L.; Yaszemski, M. J.; Mukhopadhyay, D.; Mukherjee, P. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 395-400.
- [12] You, C.-C.; Verma, A.; Rotello, V. M. *Soft Matter* **2006**, *2*, 190-204.
- [13] You, C. C.; De, M.; Rotello, V. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 639-646.
- [14] Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238-7248.
- [15] Khlebtsov, N. G.; Trachuk, L. A.; Mel'nikov, A. G. *Opt. Spectrosc.* **2005**, *98*, 77-83.
- [16] Lee, K. S.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20331-20338.
- [17] Lee, P. C.; Meisel, D. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391-3395.
- [18] Baptista, P.; Doria, G.; Henriques, D.; Pereira, E.; Franco, R. *J. Biotechnol.* **2005**, *119*, 111-117.
- [19] Kamat, P. V. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7729-7744.
- [20] Bhattacharjee, R. R.; Mandal, T. K. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *307*, 288-295.

- [21] Shim, J.-Y.; Gupta, V. K. *Journal of Colloidal and Interface Science* **2007**, 316, 977-983.
- [22] Brewer, S. H.; Glomm, W. R.; Johnson, M. C.; Knag, M. K.; Franzen, S. *Langmuir* **2005**, 21, 9303-9307.
- [23] Dawson, K. A.; Linse, S.; Lynch, I. *E-Nano Newsletter* **2007**, 10, 23-34.

CAPÍTULO 6. ESTUDO DO EFEITO DO PH NOS BIONANOCONJUGADOS

PERPECTIVA DE UTILIZAÇÃO COMO BIOSSENSOR



6.1 Introdução

Os bionanoconjugados de nanopartículas de ouro e proteínas são muito importantes pelas propriedades relevantes que exibem: as nanopartículas destacam-se pelas suas propriedades ópticas, electrónicas e magnéticas enquanto as proteínas pelas propriedades de reconhecimento, catalíticas, transporte e de inibição, podendo encontrar utilizações diversas no campo dos biossensores. Diversos sensores têm sido desenvolvidos, como por exemplo sistemas bioelectrónicos baseados em híbridos nanopartículas-enzimas e AuNP funcionalizadas para amplificação da detecção óptica de complexos de trombina em solução e à superfície [1, 2].

As interacções entre AuNP e MUA-AuNP com citocromos do tipo *c* foram descritas nos capítulos 4 e 5, formando-se bionanoconjugados estáveis, com distintas propriedades de superfície.

Diversos factores como a variação de pH, temperatura, força iónica, concentração, podem influenciar a agregação destes bionanoconjugados.

A agregação ocorre quando a distância inter-partículas se torna menor que o raio da partícula [3], sendo facilmente detectada por espectroscopia de UV-visível ao nível do desvio para o vermelho e alargamento da banda de SPR, assim como alteração de cor da solução de vermelho (sem agregação) para azul (com agregação). O processo de agregação poderá conduzir a alterações conformacionais e estruturais da proteína.

Neste contexto, são especialmente relevantes as alterações de estrutura secundária da proteína, que podem ser avaliadas por espectroscopia de dicroísmo circular. As alterações de estrutura secundária da proteína esperadas estão relacionadas com a formação de estruturas em folha β , que podem conduzir à agregação das proteínas [4]. Tal é concordante com a estrutura das fibras amilóides, características de várias patologias degenerativas onde se destacam a doença de Alzheimer, Parkinson, diabetes do tipo II e cataratas [5, 6].

No presente capítulo foi analisado o efeito do pH nos bionanoconjugados Cyt *c*-AuNP e HCC-MUA-AuNP estudados nos capítulos anteriores, por espectroscopias de UV-visível e CD e por medidas de potencial zeta, na perspectiva destes poderem ser usados como biossensores.

Os estudos de UV-visível mostraram um padrão de protonação distinto com a agregação pelo pH a 8,8 e 6,2 para os bionanoconjugados YCc-AuNP e HCc-AuNP respectivamente, e de pH 6,2 para HCc-MUA-AuNP.

Não foram verificadas por CD alterações apreciáveis na estrutura secundária do HCc no bionanoconjugado em função do pH, em oposição às alterações significativas de estrutura secundária do YCc no YCc-AuNP. A agregação nos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP foi comprovada por medidas de potencial zeta.

A alteração de cor nas soluções dos bionanoconjugados observada aos diferentes valores de pH, pode ser vantajosa como um biossensor para o estudo das alterações de conformação da proteína [7].

Parte dos resultados apresentados neste capítulo estão publicados como referência [8].

6.2 Procedimento Experimental

6.2.1 Preparação dos bionanoconjugados

Os bionanoconjugados Cyt c-AuNP com uma razão de 250 e HCc-MUA-AuNP com uma razão de 150, foram preparados como descrito nos capítulos 4 e 5.

6.2.2 Medidas de Espectroscopia

6.2.2.1 Ajuste de pH nos bionanoconjugados para Espectroscopia de UV-visível

O valor de pH de cada amostra de bionanoconjugado foi variado com a adição de pequenas gotas da solução de HCl 0,1 M. Este processo foi também realizado nas soluções de AuNP, MUA-AuNP e nas soluções de proteína.

O pH foi medido num medidor de pH Basic 20, Crison. A escolha de HCl e NaOH para o ajuste de pH tem por objectivo simplificar o conteúdo iónico da solução, tanto quanto possível, pela limitação das espécies dissolvidas em iões monovalentes Na^+ , Cl^- , H^+ e OH^- .

A utilização de tampões para controlo de pH foi descartada após ensaios preliminares que mostraram ocorrer agregação das AuNP mesmo para concentrações de cerca de 30 mM de tampões pouco complexos quimicamente, como o tampão de citrato de sódio (utilizado na gama de pH 2 - 3) ou o tampão de acetato de sódio (utilizado na gama de pH 4 - 5).

Os espectros de absorção foram efectuados imediatamente após o ajuste do valor de pH, no espectrofotómetro UV-visível, modelo UV2, UNICAM, em células de quartzo (Hellma, Alemanha), à temperatura ambiente e num intervalo de comprimento de onda de 300 a 900 nm.

6.2.2.2 Ajuste de pH nos bionanoconjugados para Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Em cada amostra de bionanoconjugado e em cada solução de proteína a pH 10 foi efectuado o ajuste de pH com a adição de pequenas gotas de ácido fosfórico 0,1 M (Pronalab). O HCl é substituído pelo H_3PO_4 no ajuste de pH nas medidas de CD, uma vez que o cloreto tem uma forte absorção, interferindo com o sinal de CD.

As experiências de dicroísmo circular foram efectuadas num espectropolarímetro Jasco-810, à temperatura controlada de 25 °C (controlador de temperatura, Julabo), no laboratório de Patologia Molecular do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica.

As amostras ao pH pretendido foram medidas numa cuvete de quartzo (Hellma, Alemanha) de 1 mm de espessura, num intervalo de comprimento de onda de 195 a 260 nm, com uma velocidade de 20 nm min⁻¹, um intervalo de amostragem de 0,1 nm e um tempo de resposta de 16 s.

A análise dos espectros de CD foi realizada online, usando o programa DICHROWEB (www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html) com o algoritmo de determinação de estrutura secundária CDSSTR⁴ [9, 10]. Os resultados foram expressos em elipticidade média por resíduo de aminoácido, (Θ), em deg cm² dmol⁻¹ a 222 nm, sendo os espectros seleccionados os que apresentaram menor razão sinal-ruído.

⁴ A autora agradece ao Dr. Luís M. A. Oliveira a análise dos espectros de CD através do programa DICHROWEB.

6.2.3 Medidas de Dispersão de Luz

6.2.3.1 Ajuste de pH nos bionanoconjugados para Medidas de Potencial Zeta

Filtrou-se 1 mL da amostra a pH 11, previamente diluída em água ultra-pura numa seringa estéril, através de um filtro de nylon de 0,45 μm de diâmetro de poro (Whatman) e ajustou-se o pH com HCl 0,1 M usando um medidor de pH Basic 20, Crison.

A amostra foi lentamente transferida para uma célula limpa de potencial zeta (poliestireno com eléctrodos metálicos revestidos a ouro, Malvern, UK), de forma a garantir que a amostra não possui bolhas de ar dentro da célula e que os eléctrodos estão completamente imersos quando da colocação das tampas nas extremidades, e foram colocadas as placas de contacto térmico a fim de proporcionar uma maior estabilidade da temperatura.

As medidas de potencial zeta foram efectuadas num Zetasizer Nano-ZS da Malvern Instruments, com um laser de He-Ne (comprimento de onda = 633 nm) a 4 mW e com um ângulo fixo de 17°. As medidas foram obtidas à temperatura controlada de 25 °C e tiveram início 15 min. após a amostra atingir o equilíbrio térmico. Cada amostra foi medida 25 vezes e em cada medida foram realizadas 65 aquisições, sendo as medidas repetidas para se estimar o erro associado.

O potencial zeta foi calculado pelo software da Malvern através da equação de Henry (equação 2 descrita no capítulo 4).

Este estudo foi desenvolvido na Unidade de Biomembranas do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

6.3 Resultados

6.3.1 Estudo do efeito do pH nas soluções de AuNP e MUA-AuNP

6.3.1.1 Efeito do pH determinado por Espectroscopia de UV-visível

A solução coloidal de AuNP estudada por espectroscopia de UV-visível de pH 11 a 2, mostra uma banda de SPR centrada a 520 nm de pH 11 a pH 4 e um desvio abrupto da banda de SPR para 639 nm a pH 3 e 678 nm a pH 2 (figura 6.1).

De pH 11 a 4 as soluções coloidais de AuNP não mostraram alterações na cor vermelha da solução, nem desvios da banda de SPR. Apresentaram cor azul a pH 3 e 2, o que demonstra agregação das AuNP a pH inferior a 4.

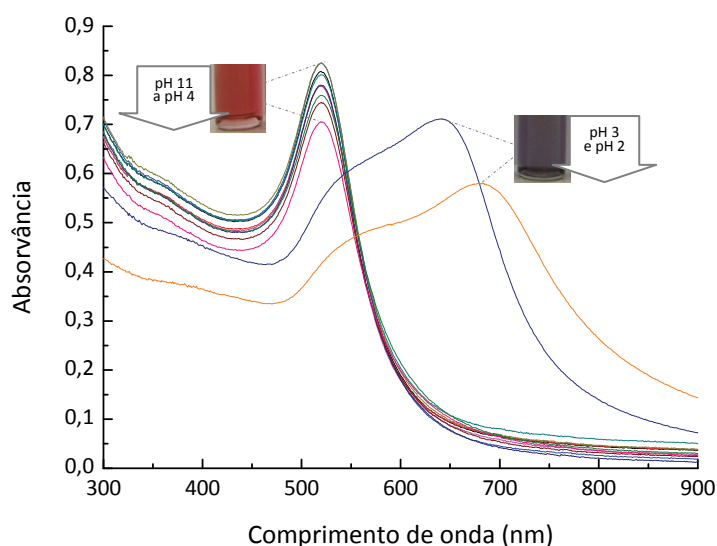


Figura 6.1 Espectros de absorção de UV-visível das soluções de AuNP em função do pH.

As soluções de MUA-AuNP analisadas de pH 11 a 2, mostram uma banda de SPR centrada a 523 nm de pH 11 a 4 e um ligeiro desvio do comprimento de onda máximo para 524 nm a pH 3,5 e 3, 525 nm a pH 2,5 e 527 nm a pH 2, como ilustra a figura 6.2. Este desvio foi visível pela mudança de cor da solução a pH inferior a 4. As soluções de MUA-AuNP apresentaram cor vermelha de pH 11 a 4 que se alterou para a cor arroxeada de pH 3,5 a 2.

Verificou-se também que a banda de SPR alarga à medida que o pH diminui, especialmente abaixo de pH 4.

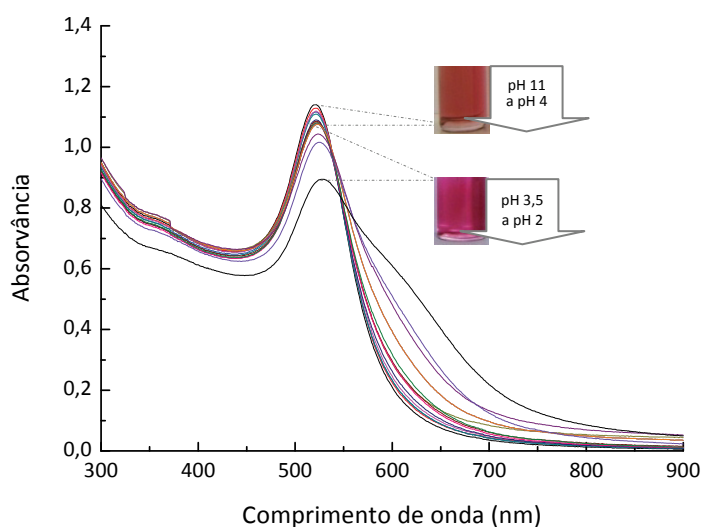


Figura 6.2 Espectros de absorção de UV-visível das soluções de MUA-AuNP em função do pH.

A valores de pH inferiores a 4, observou-se um ligeiro desvio para o vermelho na solução de MUA-AuNP, contrariamente ao desvio acentuado verificado na solução de AuNP. Esta diferença deve-se provavelmente ao facto da presença da monocamada de MUA que reveste as nanopartículas, tornando-as mais estáveis e impedindo a agregação.

As razões de absorvância entre as espécies agregadas (máximo de absorvância a 678 nm para a solução de AuNP e máximo de absorvância para a componente agregada a 630 nm para a solução de MUA-AuNP) e as espécies não agregadas (máximo de absorvância a 520 nm para a solução de AuNP e 523 nm para a solução de MUA-AuNP), são representadas graficamente em função do pH na figura 6.3.

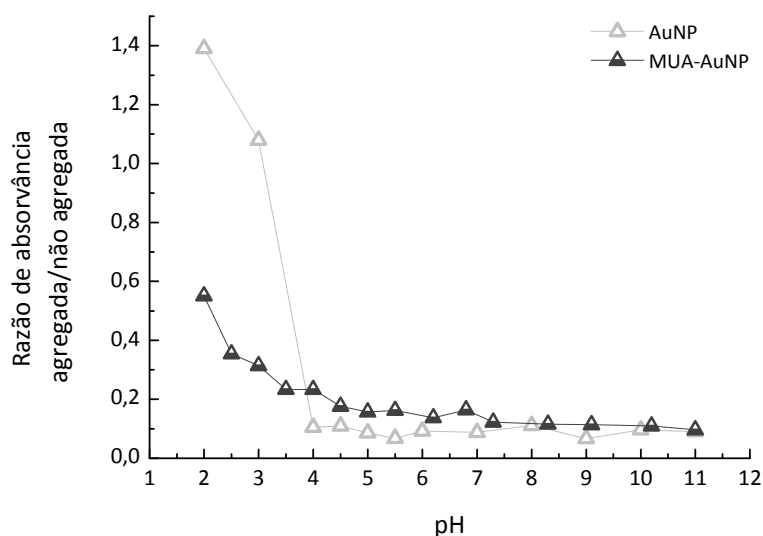


Figura 6.3 Variação da razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada em função do pH. As razões para as soluções de AuNP e MUA-AuNP são ($A_{678 \text{ nm}} / A_{520 \text{ nm}}$) e ($A_{630 \text{ nm}} / A_{523 \text{ nm}}$), respectivamente.

Pela análise da figura verifica-se que para ambas as soluções a agregação ocorre a pH inferior a 4, mas que o padrão de agregação é diferente. Na solução de AuNP a agregação ocorre de forma abrupta abaixo de pH 4, contrariamente a uma lenta agregação observada na solução de MUA-AuNP. Estes resultados são visualmente detectados pela mudança de cor de ambas as soluções a pH inferior a 4, a solução de AuNP altera a cor vermelho para azul enquanto que a solução de MUA-AuNP altera a cor vermelho para arroxeadado.

O processo de agregação da solução de AuNP a pH inferior a 4 é concordante com o valor de $pK_{a3} = 3,13$ para o citrato de sódio [11], o agente de revestimento presente nas AuNP. Tal agregação pode ser explicada pelo facto de a pH inferior a 4 o citrato de sódio se encontrar na forma neutra.

O processo de agregação da solução de MUA-AuNP abaixo de pH 4 é provavelmente influenciado por factores cinéticos, sendo mais lento que o processo de agregação da solução de AuNP, ou seja, a curva de agregação não sofre uma subida brusca abaixo deste valor de pH. A agregação inicia-se a um valor de pH que reflecte o valor de pK_a em superfícies de $5,7 \pm 0,2$ (a uma força iónica de 0,1 M) [12].

6.3.1.2 Efeito do pH determinado por Medidas de Potencial Zeta

As soluções de AuNP e MUA-AuNP foram estudadas por medidas de potencial zeta de pH 11 a 4, como ilustra a figura 6.4.

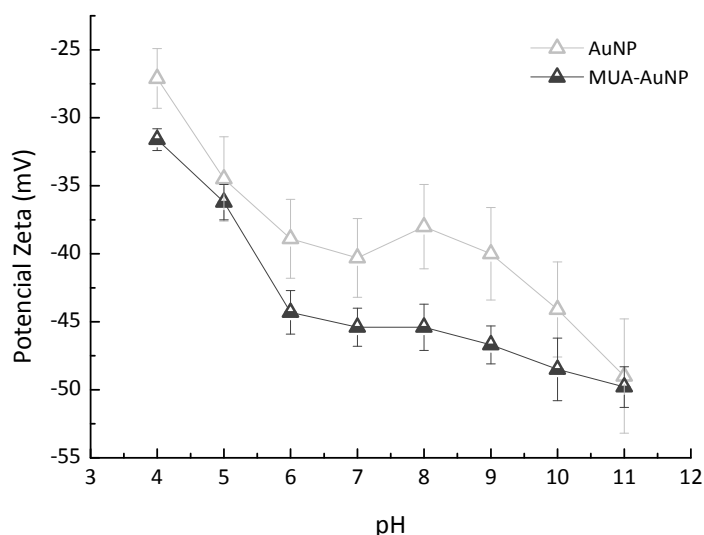


Figura 6.4 Potencial Zeta das soluções de AuNP e MUA-AuNP em função do pH. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio.

Em ambas as soluções o potencial zeta aumenta sucessivamente à medida que o pH diminui, sendo este aumento mais significativo a pH inferior a 6.

Para a solução de AuNP verifica-se um aumento de potencial zeta de $-49,0 \pm 4,2$ mV a pH 11 para $-27,1 \pm 2,2$ mV a pH 4, e para a solução de MUA-AuNP um aumento de potencial de $-49,8 \pm 1,5$ mV a pH 11 para $-31,6 \pm 0,8$ mV a pH 4. Os valores de potencial zeta medidos para a solução de AuNP são ligeiramente mais positivos que os valores de potencial zeta medidos para a solução de MUA-AuNP, o que poderá ser explicado pela presença da monocamada de MUA, que confere uma carga mais negativa às nanopartículas, relativamente a um revestimento com citrato.

O aumento mais significativo de potencial abaixo de pH 6 para a solução de MUA-AuNP, pode estar provavelmente relacionado com a protonação do grupo ácido do MUA, para o qual se observou um valor de pK_a em superfícies de $5,7 \pm 0,2$ (a uma força iónica de 0,1 M) [12].

6.3.2 Estudo do efeito do pH nos bionanoconjugados Cyt c - AuNP

6.3.2.1 Efeito do pH nos bionanoconjugados determinado por Espectroscopia de UV-visível

Os bionanoconjugados HCc-AuNP e YCc-AuNP à razão de 250 foram analisados por espectroscopia de UV-visível de pH 11 a pH 4. A figura 6.5 a ilustra os espectros de absorção dos bionanoconjugados HCc-AuNP em função do pH.

A banda de SPR mantém o seu comprimento de onda máximo a 525 nm de pH 11 a pH 6,8, apresenta um desvio para 535 nm a pH 6,6 e desvia-se para 565 nm até pH 5,9, mantendo-se em torno dos 579 nm de pH 5,7 a 4.

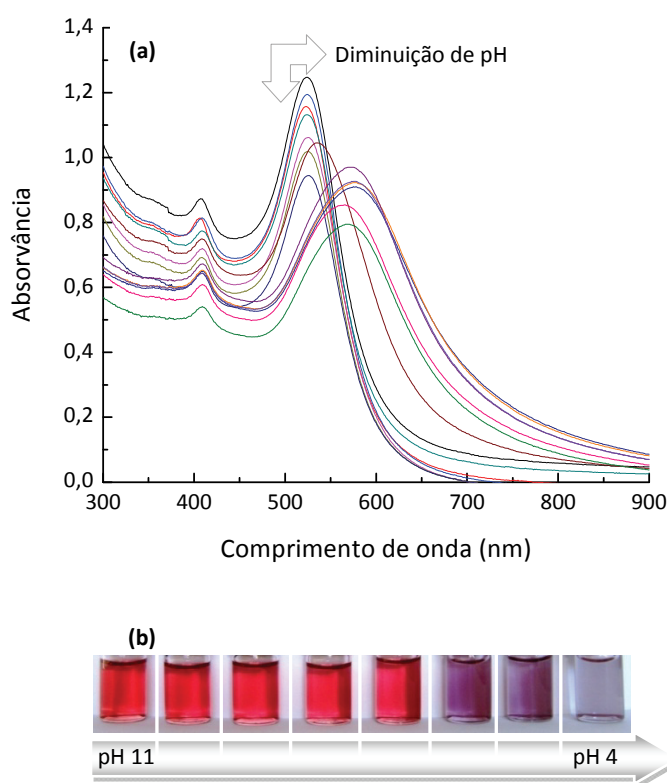


Figura 6.5 (a) Espectros de absorção de UV-visível dos bionanoconjugados HCc-AuNP à razão de 250, em função do pH e **(b)** Efeito visual do pH nos bionanoconjugados HCc-AuNP. O valor de pH dos vasos reaccionais é 11,0; 10,1; 9,2; 8,2; 7,3; 6,2; 5,0 e 4,0. As fotografias foram tiradas imediatamente após a realização do espectro de absorção a cada valor de pH.

Os espectros de absorção dos bionanoconjugados YCc-AuNP à mesma razão, mostram que de pH 11 a pH 9,2 a banda de SPR mantém o seu comprimento de onda máximo a 525 nm, desvia abruptamente para o vermelho a 551 nm ao pH 8,8 e seguidamente desvia-se para 570 nm a pH 7. Este comprimento de onda máximo mantém-se praticamente inalterado até pH 4 (figura 6.6 a).

Resultados semelhantes estão descritos na literatura, relativamente a alterações na banda de SPR com a diminuição do pH, de conjugados como o YCc-AuNP [7] e a albumina de soro de bovino (BSA) adsorvida a nanopartículas de ouro [13].

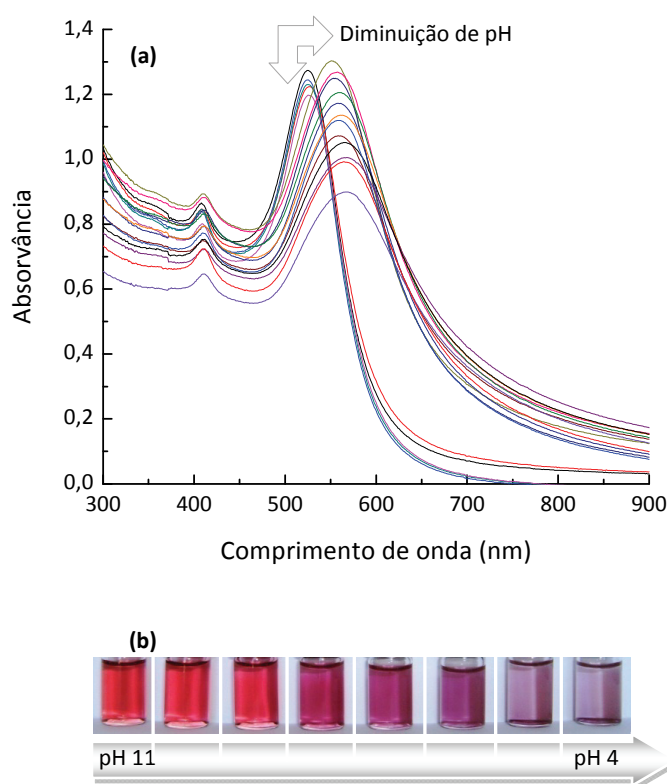


Figura 6.6 (a) Espectros de absorção de UV-visível dos bionanoconjugados YCc-AuNP à razão de 250, em função do pH e **(b)** Efeito visual do pH nos bionanoconjugados YCc-AuNP. O valor de pH dos vasos reaccionais é 11,0; 10,1; 9,2; 8,2; 7,3; 6,2; 5,0 e 4,0. As fotografias foram tiradas imediatamente após a realização do espectro de absorção a cada valor de pH.

Em ambos os bionanoconjugados, verificou-se um desvio da banda de SPR observada por espectroscopia de UV-visível, à medida que o pH diminui de 11 a 4, também visualmente detectada pela alteração de cor das soluções de vermelho para azul, o que

corresponde à agregação dos bionanoconjugados em solução, como ilustraram as figuras 6.5 b e 6.6 b.

Após 2 a 3 horas, as soluções agregadas de cor azul formam precipitados que se depositam no fundo do vaso reaccional. Resultados semelhantes estão descritos na literatura [7, 13].

As razões de absorvância entre as espécies agregadas (máximo de absorvância a 579 nm para os bionanoconjugados HCc-AuNP e a 570 nm para os bionanoconjugados YCc-AuNP) e as espécies não agregadas (máximo de absorvância a 525 nm para ambos os bionanoconjugados), são representadas graficamente em função do pH na figura 6.7.

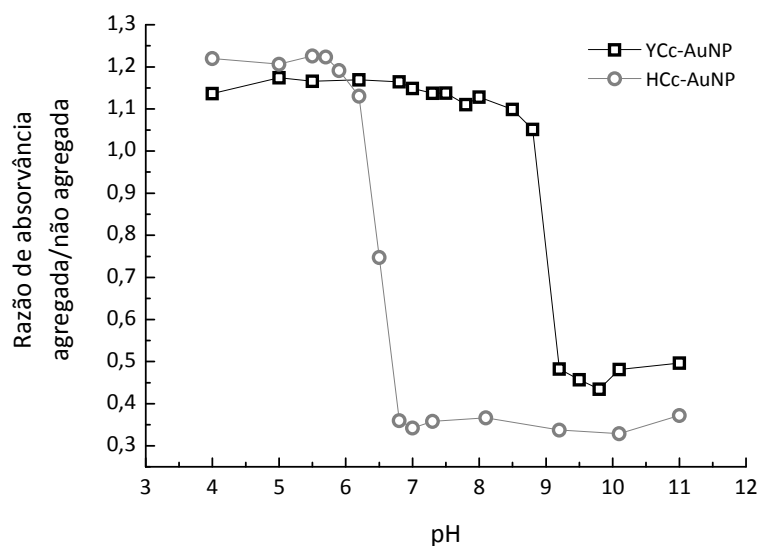


Figura 6.7 Variação da razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada em função do pH. As razões para os bionanoconjugados HCc-AuNP e YCc-AuNP são $(A_{579 \text{ nm}}) / (A_{525 \text{ nm}})$ e $(A_{570 \text{ nm}}) / (A_{525 \text{ nm}})$, respectivamente.

A derivada de cada representação permitiu determinar o ponto de viragem para o processo de agregação dos bionanoconjugados, ocorrendo a pH 6,2 para o HCc-AuNP e a pH 8,8 para o YCc-AuNP.

O citocromo *c* isolado apresenta algumas alterações na sua estrutura quando se varia o pH da solução, nomeadamente, numa titulação de pH seguida por espectroscopia de

UV-visível foram revelados 4 pK_a diferentes [14]. Estas diferentes formas da proteína derivam de alterações no enrolamento da proteína e coordenação axial do ferro do hemo [15].

No estado nativo do citocromo *c*, o grupo hemo na proteína está covalentemente ligado ao resíduo de His18 e Met80 [7]. A denominada “transição alcalina” que ocorre a um pH superior a 8, corresponde à alteração do ligando axial do grupo hemo, onde a Met80 é substituída pelo resíduo de lisina (Lys73 ou Lys79 ou em alguns casos Lys72) [16].

Nos bionanoconjugados a pH 11, a banda de Soret foi detectada a 408 nm, um valor praticamente idêntico ao apresentado pela proteína em solução (407 nm para HCc e 409 nm para YCc), como ilustram as figuras 6.8 e 6.9. Esta banda é originada pelo hemo e é muito menos intensa que a banda de SPR das AuNP.

Para os bionanoconjugados HCc-AuNP, a banda de Soret desviou-se de 406 nm a pH 10,2 para 409 nm a pH 8,2, e manteve-se para valores de pH inferiores (figura 6.8).

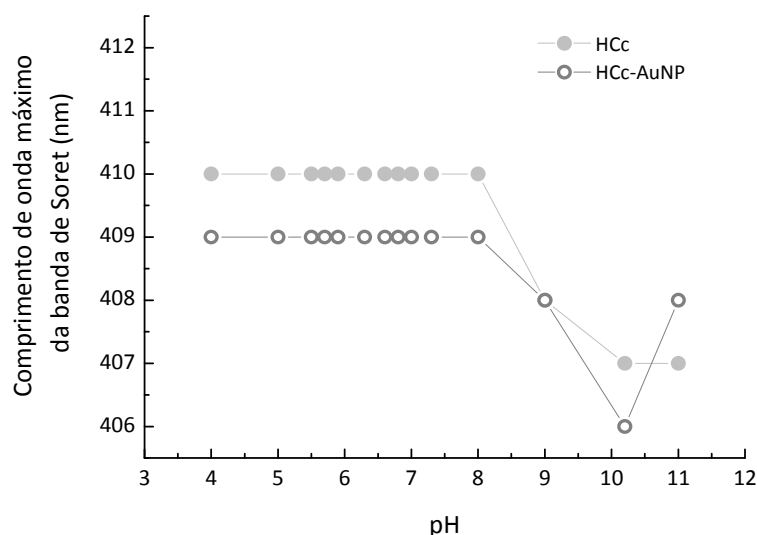


Figura 6.8 Comprimento de onda máximo da banda de Soret em função do pH, para os bionanoconjugados HCc-AuNP e para a solução de HCc.

Para os bionanoconjugados YCc-AuNP o desvio verificou-se de 408 nm a pH 10,2 para 412 nm a pH 7,3, estabilizando para valores de pH inferiores (figura 6.9).

As soluções de proteína apresentaram desvios da banda de Soret semelhantes aos obtidos nos bionanoconjugados, conforme o esperado para a transição alcalina que ocorre a pH 8,3 para o HCc e a pH 9,7 para o YCc [15].

A observação da transição alcalina de cada bionanoconjugado é semelhante à da proteína em solução, o que mostra que a integridade do hemo é provavelmente pouco afectada pela ligação da proteína às AuNP.

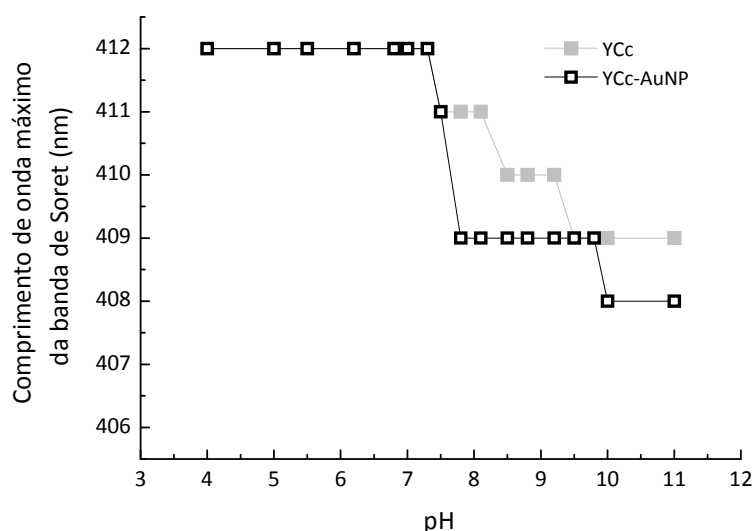


Figura 6.9 Comprimento de onda máximo da banda de Soret em função do pH, para os bionanoconjugados YCc-AuNP e para a solução de YCc.

6.3.2.2 Efeito do pH nos bionanoconjugados determinado por Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de CD é um dos métodos mais comuns usados para o estudo das conformações da proteína em solução e adsorvida a superfícies coloidais.

Com o objectivo de se compreender o comportamento conformacional do HCc e YCc nos bionanoconjugados aos diferentes valores de pH, realizaram-se as medidas de CD.

Os bionanoconjugados à razão de 250 e a solução de proteína à mesma concentração final da razão estudada (concentração final de 3 μ M) foram analisados no ultravioleta longínquo de 195 a 260 nm de pH 10 a pH 4.

Para este estudo escolheram-se valores de pH correspondentes às condições de não agregação (pH 10), condições de agregação (pH 4) e uma situação intermédia (pH 7).

Como controlo, efectuaram-se espectros de CD de ambos os citocromos *c* em solução a pH 10, 7 e 4 (figuras 6.10 a e 6.11 a).

Os espectros de ambas as proteínas em solução exibiram aos três valores de pH dois mínimos negativos a 208 e 222 nm característicos do elevado conteúdo em hélice α da proteína [17].

Nos bionanoconjugados HCc-AuNP não se verificam alterações significativas da estrutura secundária do HCc aos diferentes valores de pH e comparativamente com a proteína em solução, os bionanoconjugados mantêm uma conformação maioritariamente em hélice α , como se pode observar na figura 6.10.

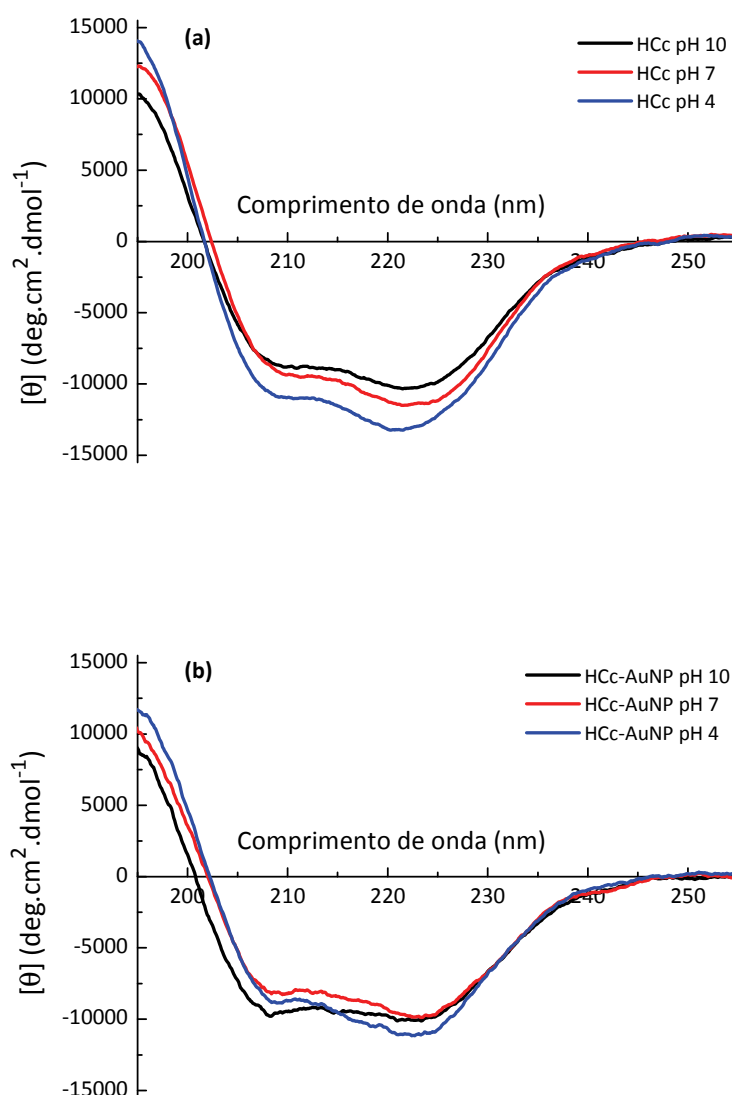


Figura 6.10 (a) Espectros de CD no ultravioleta longínquo do HCc em solução a pH 10, 7 e 4 e **(b)** Espectros de CD no ultravioleta longínquo dos bionanoconjugados HCc-AuNP a pH 10, 7 e 4.

A desconvolução dos espectros pelo algoritmo CDSSTR mostra que o HCc em solução apresenta a pH 10, 7 e 4, um conteúdo em hélice α , folha β e espiral aleatória (“random-coil”) semelhante ao dos bionanoconjugados HCc-AuNP, tal como apresentado na tabela 6.1.

Tabela 6.1 Conteúdo em hélice α , folha β e espiral aleatória (“random coil”) do HCc em solução e nos bionanoconjugados.

pH	Amostra	Conteúdo em Hélice α (%)	Conteúdo em Folha β (%)	Conteúdo em Espiral aleatória (%)
10	HCc	23	19	40
	HCc-AuNP	22	18	41
7	HCc	23	19	38
	HCc-AuNP	20	22	40
4	HCc	25	17	38
	HCc-AuNP	23	20	37

Contudo, o YCc sofreu alterações significativas de estrutura secundária quando interage com as AuNP aos três valores de pH estudados, como ilustra a figura 6.11.

O conteúdo de estrutura secundária do YCc em solução e nos bionanoconjugados aos três valores de pH está representado na tabela 6.2.

Tabela 6.2 Conteúdo em hélice α , folha β e espiral aleatória (“random coil”) do YCc em solução e nos bionanoconjugados.

pH	Amostra	Conteúdo em Hélice α (%)	Conteúdo em Folha β (%)	Conteúdo em Espiral aleatória (%)
10	YCc	31	14	38
	YCc-AuNP	22	12	52
7	YCc	25	17	39
	YCc-AuNP	18	18	43
4	YCc	32	12	36
	YCc-AuNP	15	22	45

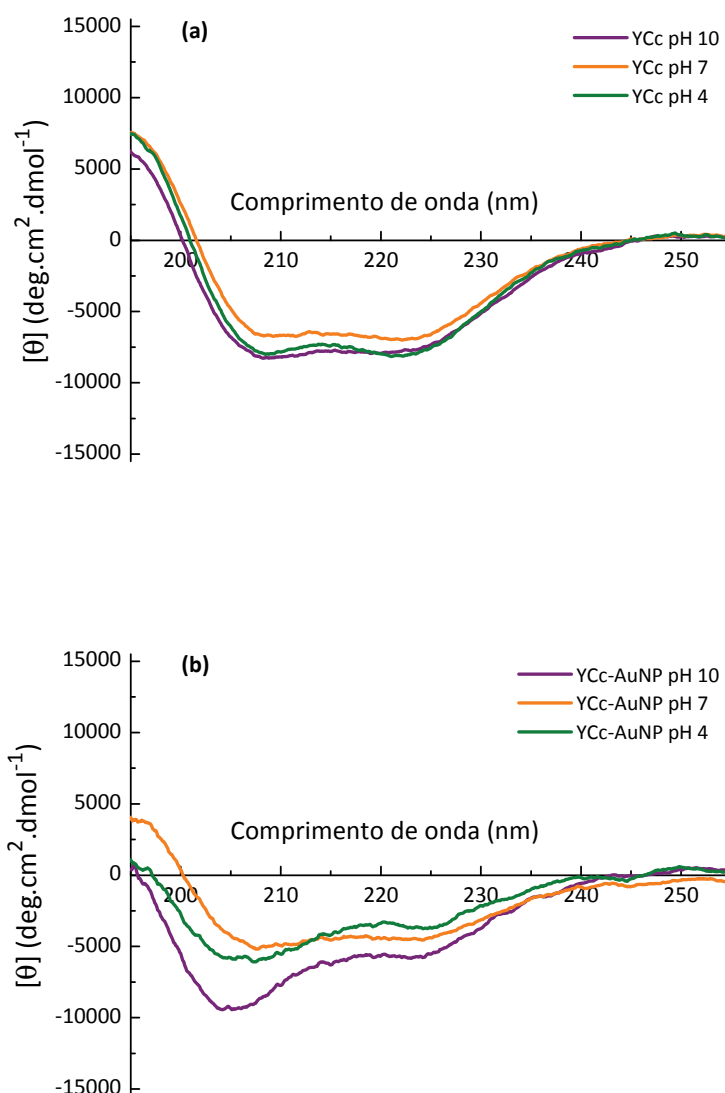


Figura 6.11 (a) Espectros de CD no ultravioleta longínquo do YCc em solução a pH 10, 7 e 4 e **(b)** Espectros de CD no ultravioleta longínquo dos bionanoconjugados YCc-AuNP a pH 10, 7 e 4.

Nos bionanoconjugados YCc-AuNP a pH 10 verificou-se uma diminuição de 9% em hélice α , um aumento de 14% em espiral aleatória (“random coil”) e um conteúdo em folha β semelhante ao da proteína em solução.

O conteúdo estrutural secundário determinado para o YCc em solução comparativamente com o bionanoconjugado a pH 7, mostrou uma diminuição em 7% do conteúdo em hélice α e não exibiu diferenças significativas em folha β e espiral aleatória.

A pH 4, o conteúdo em hélice α do YCc-AuNP é cerca de metade do determinado para o YCc em solução, o conteúdo em folha β é cerca do dobro do apresentado em solução, e um aumento de 9% em espiral aleatória foi determinado no bionanoconjugado, comparativamente com a proteína em solução.

Comparando o conteúdo de cada conformação aos três valores de pH, verificou-se que nos bionanoconjugados YCc-AuNP de pH 10 a 4, ocorre uma diminuição em hélice α e em espiral aleatória e um aumento de folha β .

A figura 6.12 representa o conteúdo em hélice α e folha β aos três valores de pH estudados. A diminuição do conteúdo em hélice α do YCc nos bionanoconjugados relativamente ao YCc em solução, corresponde à perda da estrutura secundária à medida que o pH diminui e o aumento da estrutura em folha β indica agregação da proteína, sendo o seu conteúdo mais elevado a pH 4, o que mostra claramente a agregação do YCc a pH baixo.

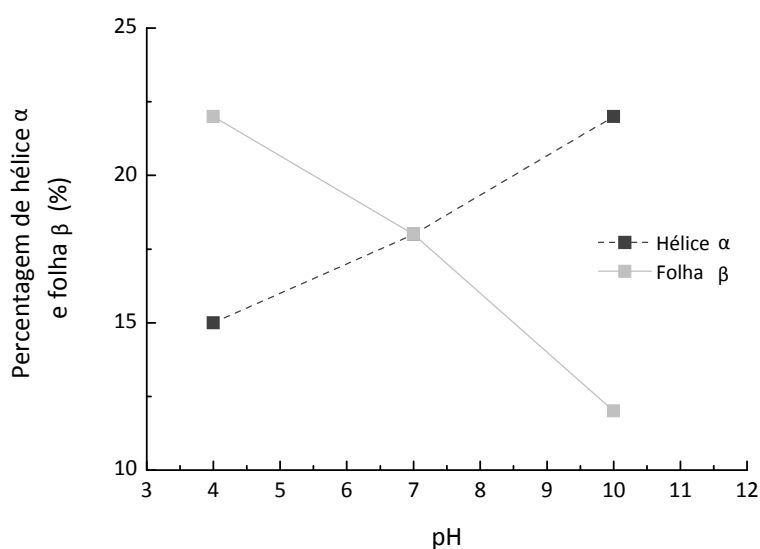


Figura 6.12 Percentagem de hélice α e folha β do YCc nos bionanoconjugados a pH 10, 7 e 4.

6.3.3 Estudo do efeito do pH nos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP

6.3.3.1 Efeito do pH nos bionanoconjugados determinado por Espectroscopia de UV-visível

Os bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP à razão de 150 foram analisados de pH 11 a 4 por espectroscopia de UV-visível. Pela figura 6.13 a, é possível observar que a banda de SPR apresenta um máximo a 525 nm de pH 11 a 8,3 e desvia-se progressivamente para o vermelho de 527 nm a 593 nm, entre pH 7 e 4, respectivamente.

Os desvios na banda de SPR são comprovados visualmente, como ilustra a figura 6.13 b.

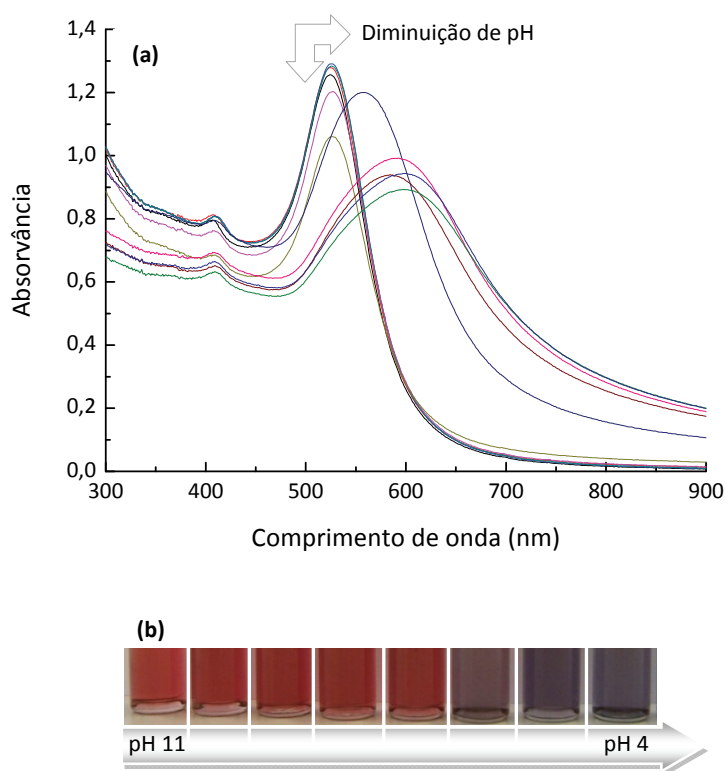


Figura 6.13 (a) Espectros de absorção de UV-visível dos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP à razão de 150, em função do pH e **(b)** Efeito visual do pH nos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP. O valor de pH dos vasos reaccionais é 11,0; 10,1; 9,2; 8,2; 7,3; 6,2; 5,0 e 4,0. As fotografias foram tiradas imediatamente após a realização do espectro de absorção a cada valor de pH.

A cor da solução dos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP à razão de 150 vai sendo alterada de vermelho para azul à medida que o pH diminui, o que mostra a formação de

agregados a pH baixo. Ao fim de poucas horas, as soluções agregadas precipitaram, depositando-se os precipitados no fundo do vaso reaccional.

A representação gráfica da razão de absorvância entre a espécie agregada e a espécie não agregada (máximo de absorvância a 593 nm e 525 nm, respectivamente) em função do pH, é apresentada na figura 6.14.

O ponto de viragem determinado para o processo de agregação dos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP, através da derivada da representação ocorreu a pH 6,2.

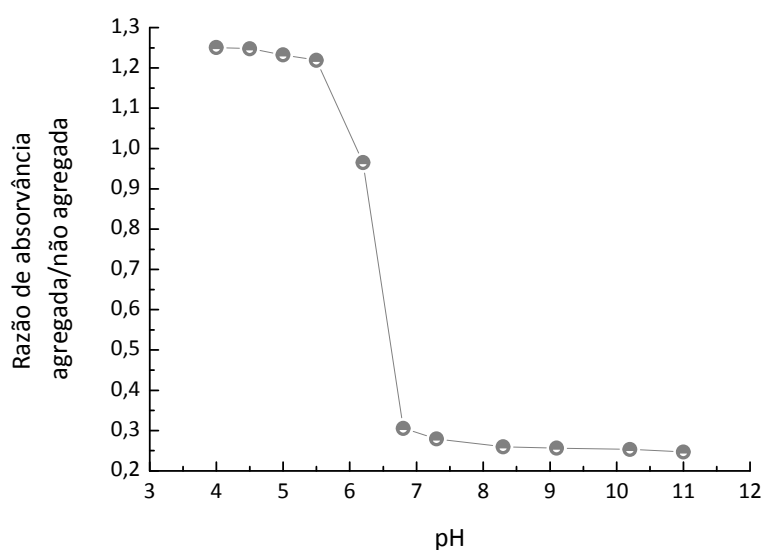


Figura 6.14 Variação da razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada ($A_{593\text{ nm}} / A_{525\text{ nm}}$) em função do pH, para os bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP.

6.3.3.2 Efeito do pH nos bionanoconjugados determinado por Medidas de Potencial Zeta

Os bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP à razão de 150, a solução de proteína à mesma concentração final da razão estudada (concentração final de 0,5 μM) e a solução de MUA-AuNP (apresentada na secção 6.3.1.2) foram estudados por medidas de potencial zeta de pH 11 a 4, como ilustra a figura 6.15.

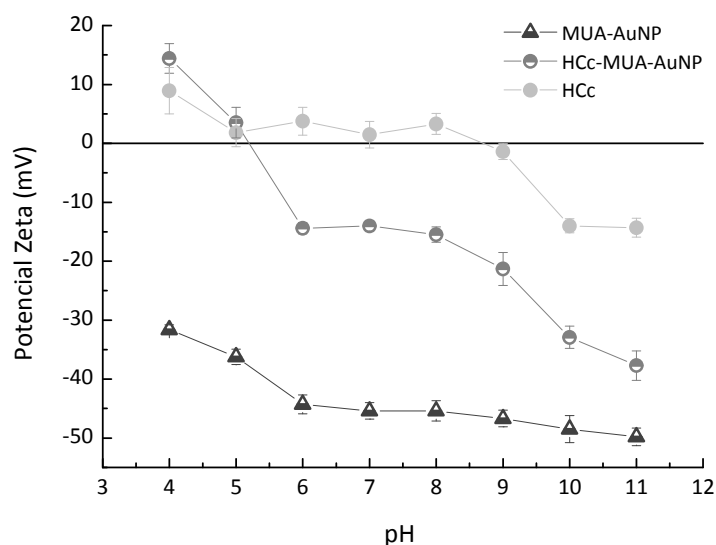


Figura 6.15 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP à razão de 150, da solução de MUA-AuNP e de HCC, em função do pH. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio.

Em todos os casos estudados, a diminuição do pH levou a um aumento dos valores de potencial zeta para valores menos negativos.

Os bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP mostraram um aumento gradual do valor de potencial zeta à medida que o pH diminui de $-37,7 \pm 2,5$ mV a pH 11 para $14,4 \pm 2,5$ mV a pH 4. Valores de potencial zeta positivos são observados a pH inferior a 6. Os bionanoconjugados apresentam valores de potencial zeta mais positivos que a solução de MUA-AuNP, devido à carga positiva da proteína em solução.

O HCC sozinho em solução apresenta valores de potencial zeta que se aproximam de 0 mV abaixo de pH 10, e são positivos aos valores de pH inferiores a 9 mostrando um potencial de $8,94 \pm 3,94$ mV a pH 4. Pela figura 6.15 é possível identificar o ponto isoelétrico do HCC a pH = 9, que é concordante com o pI de 9,6 determinado teoricamente para esta proteína.

Com o objectivo de se analisar a carga de superfície dos bionanoconjugados sem a presença da monocamada de MUA, foram realizadas medidas de potencial zeta em função

do pH em bionanoconjugados HCc-AuNP à mesma razão ($[HCc] / [AuNP]$ de 150) que se utilizou para o estudo com bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP.

Apresentam-se os resultados na figura 6.16. Pela análise da figura verifica-se que nos bionanoconjugados HCc-AuNP os valores de potencial zeta aumentam à medida que o pH diminui de $-32,6 \pm 7,5$ mV a pH 11 para $16,1 \pm 1,75$ mV a pH 4, sendo próximos dos valores de potencial zeta determinados para HCc-MUA-AuNP.

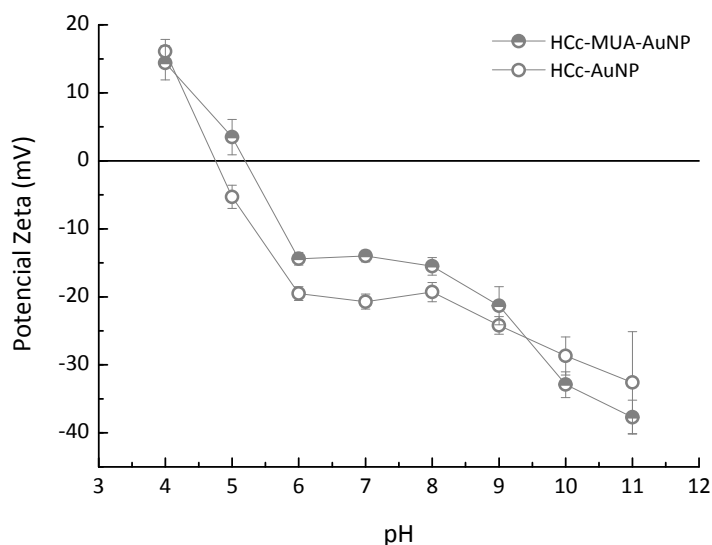


Figura 6.16 Potencial Zeta dos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP e HCc-AuNP à razão de 150, em função do pH. Cada ponto é uma média de experiências em triplicado e as barras de erro representam o desvio padrão médio.

6.4 Discussão de Resultados

A estabilidade em solução dos bionanoconjugados Cyt c-AuNP estudada por espectroscopia de UV-visível e por dicroísmo circular mostrou uma forte dependência com o pH, sendo a principal observação a ocorrência de agregação a valores de pH básico e ácido, e correspondente alteração da cor da solução, que passa de vermelho a azul, à medida que o pH diminui de 11 a 4, em oposição à solução coloidal de AuNP.

Nos bionanoconjugados Cyt c-AuNP a agregação iniciou-se a um pH mais alto para YCc-AuNP do que para HCc-AuNP, pH 8,8 e 6,2, respectivamente. Esta diferença pode estar relacionada com a estabilidade da estrutura da proteína, sendo mais instável nos

bionanoconjugados YCc-AuNP comparativamente com HCc-AuNP, como reflectido nos resultados de CD.

A banda de SPR dos bionanoconjugados agregados a pH 4 ocorreu a 570 nm para o YCc-AuNP e 579 nm para o HCc-AuNP, o que parece indicar que a distância inter-partículas é mais pequena no HCc-AuNP do que no YCc-AuNP, dado que agregados maiores de AuNP levam ao deslocamento para o vermelho da banda de SPR [18].

Os resultados de CD mostraram que as alterações de conformação da proteína são praticamente ausentes nos bionanoconjugados HCc-AuNP aos valores de pH estudados. Pelo contrário, em YCc-AuNP verificou-se uma diminuição do conteúdo em hélice α de 22% na forma não agregada (a pH 10) para 15% na forma agregada (a pH 4), o que indica uma perda de estrutura secundária da proteína. O conteúdo em folha β no bionanoconjugado YCc-AuNP a pH 10 aumentou para cerca do dobro a pH 4, correspondendo este aumento a alterações na estrutura secundária da proteína que conduzem à sua agregação [19]. Estando estas alterações na estrutura secundária do YCc nos bionanoconjugados pelo efeito do pH, associadas à agregação dos bionanoconjugados em solução, pode concluir-se que a alteração de cor das soluções de bionanoconjugados pode ser usada como um sensor para o estudo das alterações conformacionais da proteína. Esta conclusão está de acordo com o estudo levado a cabo por Chah e colaboradores em que a agregação das nanopartículas de ouro está directamente relacionada com a conformação da proteína ligada, podendo as AuNP formar um simples e económico sensor para detecção de alterações de conformação da proteína [7].

Relativamente à estrutura dos agregados YCc-AuNP, pode-se pôr a hipótese da proteína nestes bionanoconjugados ter uma conformação mais desenrolada do que no HCc-AuNP, o que pode formar uma coroa esférica de proteína mais espessa ao redor da nanopartícula de ouro, conduzindo a uma maior distância inter-partículas, que se reflecte no menor comprimento de onda do máximo de absorvância da banda de SPR, relativamente à apresentada por HCc-AuNP. Uma investigação semelhante foi desenvolvida por Rotello e colaboradores, em que mostraram que uma camada densa de proteína à superfície das AuNP funcionalizadas conduz a um maior espaço inter-partículas [20].

Uma outra hipótese é o HCc com a diminuição do pH poder dissociar-se da AuNP, conduzindo a uma menor distância inter-partículas, que se reflecte num maior comprimento

de onda do máximo de absorvância da banda de SPR, comparativamente com a apresentada pelo YCC-AuNP.

Se esta hipótese for a mais correcta, a presença de HCc influencia a agregação dos bionanoconjugados, o que é comprovado pelo facto da solução de AuNP sem proteína não agregar entre pH 11 e 4. A possível dissociação do HCc da AuNP à medida que o pH diminui, também explica os resultados de CD, em que a proteína nos bionanoconjugados apresentou uma estrutura maioritariamente em hélice α , tal como em solução.

Os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP também mostraram uma forte dependência com o pH, comprovada por espectroscopia de UV-visível e medidas de potencial zeta. Pela espectroscopia de UV-visível verificou-se que a agregação dos bionanoconjugados inicia-se a pH ligeiramente ácido (6,2) e que ocorreram alterações na cor da solução de vermelho para azul com a diminuição do pH de 11 a 4, contrariamente ao observado com a solução coloidal de MUA-AuNP neste intervalo de pH.

Para se analisar a influência da SAM de MUA no processo de agregação dos bionanoconjugados por espectroscopia de UV-visível, o mesmo estudo foi efectuado com bionanoconjugados HCc-AuNP à mesma razão ($[HCc] / [AuNP] = 150$). Como ilustra a figura 6.17 o ponto de viragem determinado para o processo de agregação dos bionanoconjugados HCc-AuNP à razão de 150 ocorreu a pH 6,2, tal como verificado nos bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP à mesma razão, o que parece reflectir que a presença da monocamada de MUA não influencia a agregação dos bionanoconjugados, uma vez que ocorre ao mesmo valor de pH. No entanto, a banda de SPR do HCc-MUA-AuNP agregado a pH 4 ocorreu a 593 nm, a um comprimento de onda superior ao observado para HCc-AuNP (580 nm), o que parece mostrar que a distância inter-partículas é menor nos bionanoconjugados funcionalizados, relativamente aos bionanoconjugados não funcionalizados. Este resultado pode ser provavelmente devido ao HCc com a diminuição do pH se poder dissociar da MUA-AuNP, conduzindo a uma menor distância inter-partículas e consequente agregação do bionanoconjugado funcionalizado a pH baixo.

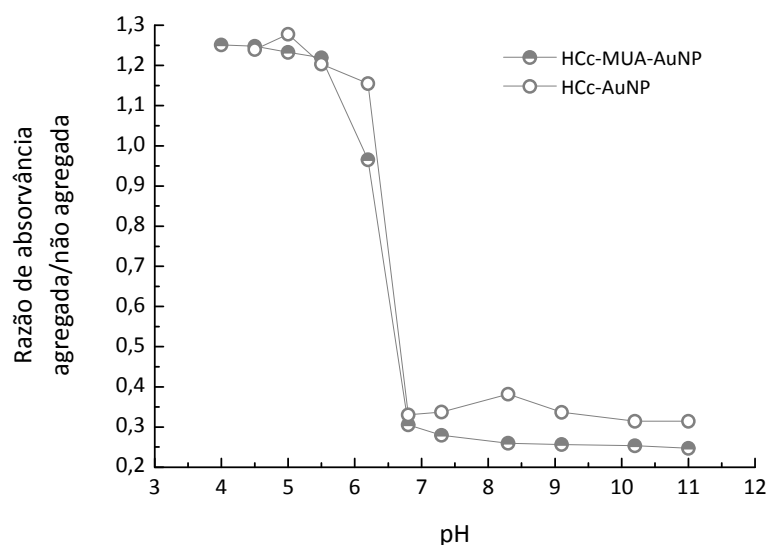


Figura 6.17 Variação da razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada em função do pH. As razões para os bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP e HCC-AuNP são $(A_{593\text{ nm}} / A_{525\text{ nm}})$ e $(A_{580\text{ nm}} / A_{525\text{ nm}})$, respectivamente.

O facto da monocamada de MUA não influenciar a agregação dos bionanoconjugados como verificado por espectroscopia de UV-visível, também é demonstrado por medidas de potencial zeta.

Em ambos os bionanoconjugados HCC-MUA-AuNP e HCC-AuNP os valores de potencial zeta são semelhantes e aumentam à medida que o pH diminui, aproximaram-se de zero a pH inferior a 6, o que parece mostrar a formação de agregados (a interação electrostática deixa de ocorrer e as interações de Van der Waals conduzem à agregação [21]). Tal é concordante com as mudanças de cor das soluções observadas por espectrofotometria de UV-visível, e o valor de pH 6,2 determinado para o processo de agregação de ambos os bionanoconjugados. A hipótese do HCC se poder dissociar do bionanoconjugado à medida que o pH diminui pode explicar estes resultados, uma vez que a dissociação da proteína pode levar a uma menor distância inter-partículas e à agregação destas a pH inferior a 6.

6.5 Conclusões

Em conclusão, a espectroscopia de UV-visível para os bionanoconjugados HCc-AuNP e YCc-AuNP revelou diferentes padrões de protonação como determinado pelo pH que induz a agregação; os bionanoconjugados YCc-AuNP apresentaram uma agregação a pH básico (pH = 8,8) enquanto que HCc-AuNP mostrou uma agregação a pH ligeiramente ácido (pH = 6,2).

O estudo de CD demonstrou que o pH do meio tem uma grande influência nas alterações conformacionais da proteína quando esta se encontra sob a forma de bionanoconjugado. Estas alterações foram somente observadas para o YCc no bionanoconjugado, em que o conteúdo em hélice α diminuiu e o conteúdo em folha β aumentou à medida que o pH diminuiu, revelando agregação da proteína.

A espectroscopia de UV-visível para os bionanoconjugados HCc-MUA-AuNP mostrou agregação a pH ligeiramente ácido (pH = 6,2), o que é concordante com os valores de potencial zeta. Estes aumentaram à medida que o pH diminuiu e aproximaram-se de zero a pH inferior a 6, indicando a formação de agregados.

Uma vez que os bionanoconjugados apresentam diferentes propriedades de superfície, as proteínas diferentes estruturas secundárias e a agregação dos bionanoconjugados está directamente relacionada com a conformação da proteína adsorvida às AuNP, investigando as interações proteína - nanopartícula metálica pode ser possível formar bionanoconjugados com novas propriedades de superfície, com o objectivo de serem usados como biossensores e com potenciais aplicações em bioensaio.

6.6 Bibliografia

- [1] Katz, E.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042-6108.
- [2] You, C. C.; De, M.; Rotello, V. M. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9*, 639-646.
- [3] Aryal, S.; Bahadur, R.; Bhattarai, N.; Kim, C. K.; Kim, H. Y. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 191-197.
- [4] Vetri, V.; Militello, V. *Biophysical Chemistry* **2005**, *113*, 83-91.
- [5] Long, X.; Zhang, C.; Cheng, J.; Bi, S. *Spectrochimica Acta Part A* **2008**, *68*, 71-77.

- [6] Quintas, A.; Freire, A. P.; Halpern, M. J. *Bioquímica, Organização Molecular da Vida*; Lidel - Edições Técnicas, Lisboa, Portugal, 2008.
- [7] Chah, S.; Hammond, M. R.; Zare, R. N. *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 323-328.
- [8] Gomes, I.; Santos, N. C.; Oliveira, L. M. A.; Quintas, A.; Eaton, P.; Pereira, E.; Franco, R. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 16340-16347.
- [9] Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, 668-673.
- [10] Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Biopolymers* **2008**, *89*, 392-400.
- [11] Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; 82nd edition, Hardcover, 2001.
- [12] Smalley, J. F.; Chalfant, K.; Feldberg, S. W. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 1676-1685
- [13] Shang, L.; Wang, Y. Z.; Jiang, J. G.; Dong, S. J. *Langmuir* **2007**, *23*, 2714-2721.
- [14] Theorell, H.; Akesson, A. *J. Am. Chem. Soc* **1941**, *63*, 1812-1818.
- [15] Scott, R. A.; Mauk, A. G. *Cytochrome c: A multidisciplinary approach*; University Science Books: Sausalito, CA, 1995.
- [16] Assfalg, M.; Bertini, I.; Dolfi, A.; Turano, P.; Mauk, A. G.; Rosell, F. I.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2913-2922.
- [17] Drake, A. F. *Protein-Ligand Interactions: structure and spectroscopy*; Harding, S. E.; Chowdhry, B. Z.; Eds.; Oxford University Press Inc., New York, 2001.
- [18] Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1025-1102.
- [19] Talmard, C.; Yona, R. L.; Faller, P. J. *Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 449-455.
- [20] Srivastava, S.; Verma, A.; Frankamp, B. L.; Rotello, V. M. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 617-621.
- [21] Volodkin, D.; Ball, V.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Mohwald, H. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, *1768*, 280-290.

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES GLOBAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

7.1 Conclusões Globais

Na presente tese foram investigadas as interacções de proteínas com superfícies nanoestruturadas e nanopartículas de metais nobres.

A interacção de proteínas com superfícies nanoestruturadas de prata foi estudada pela transferência electrónica de citocromos c_3 do Tipo I e Tipo II adsorvidos em duas monocamadas auto-montadas (SAM) de dois tipos distintos (terminação ácida e terminação maltose) à superfície de eléctrodos de prata. Comparando o desempenho espectroelectroquímico de ambas as monocamadas, concluiu-se ser a SAM de maltose uma superfície mais adequada e promissora para a espectroelectroquímica das proteínas hémicas analisadas, na medida em que permitiu a determinação dos potenciais de redução para os quatro hémicos dos citocromos c_3 e apresentou uma maior intensidade do sinal de SERRS comparativamente com a SAM de ácido. Tal aumento de intensidade pode dever-se ao facto desta SAM interagir com as proteínas adsorvidas possivelmente por pontes de hidrogénio e de forma independente do pH, em oposição à SAM de ácido, cuja interacção com as proteínas ocorre maioritariamente por via electrostática.

A interacção de proteínas com superfícies nanoestruturadas de ouro foi analisada por AFM, sendo imobilizada a ferroquelatase recombinante de fígado de rato em SAM de alcanotóis com diferentes funcionalidades à superfície de ouro.

A enzima adsorveu preferencialmente na SAM pura neutra-hidrofóbica (100% CH_3), na SAM mista 50% COO^- : 50% CH_3 e através da ligação covalente a monocamadas de COOH activada por EDC/NHS ou de DSP. Deste modo, concluiu-se que a adsorção de proteínas por via electrostática ou por forças de Van der Waals também permite uma considerável imobilização da proteína, favorecendo a manutenção da sua actividade enzimática, em oposição à ligação por via covalente amplamente utilizada. Este estudo permitiu compreender como o modo de adsorção da proteína à superfície de ouro é determinante para a escolha da SAM, contribuindo para a definição de superfícies promissoras para o desenvolvimento de biossensores específicos.

A interacção de proteínas com nanopartículas de ouro foi analisada pela formação de bionanoconjugados Cyt *c*-AuNP e Cyt *c*-MUA-AuNP e foram estudadas as suas propriedades superficiais na perspectiva de utilização como biossensores.

A formação de bionanoconjugados estáveis HCc-AuNP ou YCc-AuNP foi demonstrada pelo desvio de 5 nm para o vermelho da banda de SPR dos bionanoconjugados em comparação com a banda de SPR das AuNP em solução, pela formação demonstrada por AFM, de uma camada de proteína de cerca de 2 nm em torno da AuNP no bionanoconjugado YCc-AuNP, e por um potencial zeta uniforme atribuído por cerca de 200 moléculas de citocromo *c* por nanopartícula, tal como avaliado por medidas de potencial zeta. Os bionanoconjugados formados apresentaram diferentes propriedades de superfície, o que se pode relacionar com os diferentes modos de interacção que apresentam com a nanopartícula: HCc interage com a AuNP via interacções electrostáticas e YCc interage com a AuNP via ligação covalente pelo resíduo de cisteína 102.

A formação do bionanoconjugado HCc-MUA-AuNP foi demonstrada pelo desvio de 2 nm para o vermelho da banda de SPR do bionanoconjugado em relação à banda de SPR da MUA-AuNP em solução, e por um potencial zeta uniforme atribuído por cerca de 100 moléculas de HCc por AuNP funcionalizada, formando uma monocamada simples que recobre a superfície da MUA-AuNP, em oposição à monocamada densa formada no bionanoconjugado HCc-AuNP.

O modo de ligação electrostático parece assim funcionar de modo mais eficaz entre os MUA e a proteína comparativamente com a superfície de citrato das AuNP, o que revela que a funcionalização é uma estratégia eficaz para a formação de bionanoconjugados Cyt *c*-AuNP mais estáveis e robustos.

O estudo do efeito do pH mostrou um diferente padrão de protonação para os bionanoconjugados Cyt *c*-AuNP e HCc-MUA-AuNP e uma forte dependência da estrutura secundária da proteína com o pH do meio. Os bionanoconjugados YCc-AuNP apresentaram uma agregação a pH básico, enquanto que os bionanoconjugados HCc-AuNP e HCc-MUA-AuNP apresentaram uma agregação ao mesmo valor de pH ácido, uma observação que suporta a conclusão das propriedades de superfície do bionanoconjugado dependerem apenas da face exposta da proteína, que parece ser a mesma, independentemente da diferente funcionalização (citrato ou MUA) da AuNP que as suporta.

As alterações de estrutura secundária da proteína foram apenas verificadas para o YCc no bionanoconjugado, enquanto que o HCc manteve a sua estrutura secundária nativa no bionanoconjugado.

Este estudo demonstrou ser possível a formação de bionanoconjugados com propriedades de superfície distintas, nomeadamente em termos de valores de potenciais de superfície e pH de agregação, o que indicia a possibilidade da sua aplicação em bioensaios e biossensores.

Pelo trabalho de investigação desenvolvido na presente tese pode concluir-se que as superfícies nanoestruturadas de metais nobres são superfícies privilegiadas para a adsorção de proteínas, com vista a aplicações no desenvolvimento de biossensores, sendo no entanto necessário seleccionar a superfície de modo a garantir o sucesso da imobilização da proteína, evitando a inactivação da sua actividade enzimática.

7.2 Perspectivas Futuras

O trabalho de investigação apresentado pode ser futuramente desenvolvido em diversas vertentes.

O estudo da transferência electrónica em citocromos c_3 adsorvidos a eléctrodos de prata pode ser aplicado a diferentes proteínas hémicas, usando SAM de alcanotíóis com diferentes funcionalidades e pode ser efectuado tanto por espectroscopia de ressonância de Raman (nomeadamente SERRS), como por microbalança de cristal de quartzo acoplada a electroquímica (EQCM). A SERRS também pode permitir a detecção e caracterização de moléculas únicas ou aglomeradas, adsorvidas em nanopartículas de prata ou ouro, com potenciais aplicações em materiais nanoestruturados e detecção sensível de fármacos.

Dado que a imobilização das proteínas/enzimas em superfícies nanoestruturadas pode preservar a função da proteína ou induzir a perda de actividade catalítica da mesma, a medição da actividade da enzima é de extrema importância para a obtenção de superfícies com propriedades catalíticas.

A imobilização de proteínas/enzimas em suportes sólidos ou eléctrodos pode ser aplicada na construção de biossensores e dispositivos biocatalíticos, podendo esta imobilização ser caracterizada por outras técnicas não utilizadas neste trabalho, como por exemplo microscopia de efeito de túnel (STM), voltametria cíclica (CV), microbalança de cristal de quartzo (QCM) e elipsometria.

As AuNP têm sido extremamente usadas em bionanotecnologia pelas suas propriedades ópticas, electrónicas, magnéticas e catalíticas únicas, e pela facilidade de preparação, controlo de tamanho, baixo custo e fácil funcionalização. A conjugação de AuNP com diferentes funcionalizações com as propriedades das biomoléculas permite inúmeras aplicações em por exemplo, ensaios biológicos, diagnóstico clínico e terapêutico, monitorização ambiental e em saúde humana.

A capacidade de agregação das AuNP funcionalizadas (facilmente detectável pela mudança de cor) está directamente relacionada com alterações na conformação das proteínas, o que pode criar sensores simples e económicos capazes de estudar alterações conformacionais da proteína e possível agregação. Estes biossensores podem ser aplicados ao estudo de doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Alzheimer ou Parkinson, contribuindo para o seu diagnóstico e para possíveis tratamentos.

O estudo das interações proteína-nanopartícula é de extrema importância, uma vez que a associação de proteínas com nanopartículas em fluidos biológicos torna-se uma entidade biológica relevante que interage com as células, e que pode ter potencial aplicação em nanomedicina e nanotoxicologia.

A investigação das propriedades das biomoléculas em combinação com as propriedades das AuNP ainda está numa fase muito inicial de desenvolvimento e constitui um grande desafio para o futuro da área da Bionanotecnologia.

APÊNDICES

Apêndice I Síntese e purificação do neoglicoconjugado de maltose

A síntese e a purificação do neoglicoconjugado de maltose foram efectuadas de acordo com o procedimento publicado na literatura [1] em colaboração com a Professora Soledad Penadés e o Doutor David Alcántara, no Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Sevilla, Espanha. As etapas que compõem a síntese são ilustradas esquematicamente na figura A.1 e descritas seguidamente.

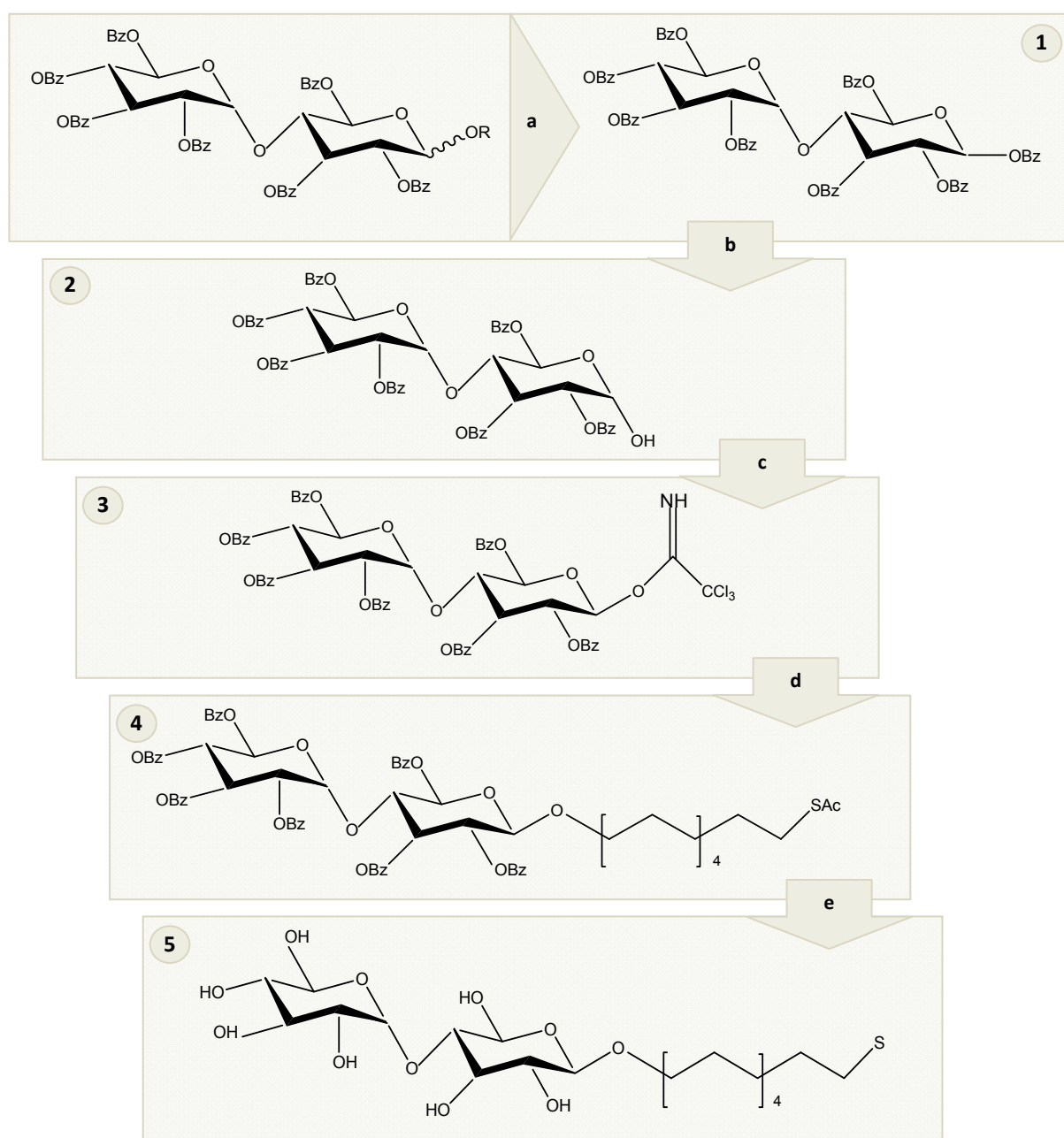


Figura A.1 Representação esquemática da síntese do neoglicoconjugado de maltose.

a) Reacção da maltose comercial (20 g, 55,4 mmol) com cloreto de benzoílo - BzCl (80 mL, 66,4 mmol) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 200 mL), a 0 °C, com agitação.

b) Reacção do produto **1** com 2,35 g de acetato de hidrazina em dimetilformamida - DMF (C₃H₇NO, 50 mL), a 55 °C durante 1 h. e com agitação.

c) Reacção do produto **2** (5,65 g, 5,276 mmol) com diclorometano seco (CH₂Cl₂, 40 mL) em agitação, triclouroacetoneitrilo (Cl₃CCN, 7,93 mL, 79,15 mmol) e DBU (1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene, 1,5 mL), durante 3 h. a temperatura ambiente com agitação.

d) Reacção do produto **3** (3,84 g, 3,16 mmol) com C₁₃H₂₆O₂S (1,16 g, 4,74 mmol), deixou-se secar bem. Adicionou-se sob árgon CH₂Cl₂ seco (15 mL) e trimetilsilil trifluorometanossulfonato - TMSOTf (CF₃SO₃Si(CH₃)₃, 69,8 µL, 0,379 mmol). Reacção durante 1 h. a temperatura ambiente com agitação.

e) Dissolveu-se o produto **4** (1,8 g, 1,386 mmol) em CH₂Cl₂ (15 mL), adicionou-se MeOH (25 mL) em agitação e MeONa (2 mL, 2,08 mmol). Reacção durante 2 h. 30 min. a temperatura ambiente, com agitação. Após desprotecção, formou-se o neoglicoconjugado de maltose - **5**, com um rendimento de cerca de 70%.

Todos os produtos foram analisados por cromatografia em camada fina - TLC (placas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄, Merck, com o eluente: acetato de etilo/hexano 1:1, e reveladas com o revelador anisaldeído - específico para identificação de açúcares), purificados em colunas de cromatografia de sílica gel 60 (0,2 - 0,5 mm, Merck) num gradiente de hexano/acetato de etilo, e caracterizados por espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) em clorofórmio deuterado, sendo os espectros de RMN de ¹H e ¹³C adquiridos num espectrómetro Bruker DPX-300. Os reagentes usados tinham grau de pureza p.a. e foram obtidos comercialmente de Merck e Sigma-Aldrich.

Apêndice II Preparação dos eléctrodos de prata

Os eléctrodos de prata foram polidos por pressão sobre uma folha de óxido de alumínio, com um tamanho de grão de 5 a 1 μm , até a superfície do eléctrodo parecer um espelho. Após polimento os eléctrodos foram colocados na célula electroquímica com uma solução de KCl a 0,1 M e sujeitos a três ciclos electroquímicos de oxidação/redução (+0,3 volt, 1 min. / -0,3 volt, 1 min; potencióstato Princeton Applied Systems), para que os eléctrodos de prata fiquem activados de forma a facilitar a adsorção dos alcanotióis a partir da solução etanólica de C₁₁-ácido e C₁₁-maltose.

Apêndice III Isolamento e purificação da ferroquelatase recombinante de fígado de rato

O isolamento e a purificação da ferroquelatase recombinante de fígado de rato foram efectuados segundo um procedimento adaptado de Ferreira [2].

O procedimento experimental realizado foi o seguidamente descrito:

Inoculou-se uma placa contendo o meio “Luria Broth” - LB sólido (composição descrita no apêndice III.1.1) com a cultura de células de *E. coli* contendo o plasmídeo pGF42, foi mantida na estufa a 37 °C durante a noite, verificando-se o aparecimento de colónias individualizadas. Uma destas colónias foi repicada para 50 mL de meio LB líquido (composição descrita no apêndice III.1.2), ao qual foi adicionado 50 µL de ampicilina a 50 mg/mL. A ampicilina foi adicionada uma vez que o plasmídeo apresenta uma marca de resistência a este antibiótico, de modo a garantir a selecção de células que o contêm. O meio foi incubado por 18 horas a 37 °C com agitação (incubadora Gallenkamp). Esta cultura foi usada como inóculo de um meio com fosfato limitante (composição do meio apresentada no apêndice III.1.3), onde ocorreu a sobre-produção da ferroquelatase. O meio foi incubado a 37 °C, com agitação vigorosa. Após este período, as células foram centrifugadas (centrífuga Beckman Avanti J-25, rotor JA-10) a 6000 rpm, durante 10 min. a 4 °C, obtendo-se cerca de 4 g de células por litro de cultura.

Para o isolamento da proteína, as células obtidas foram ressuspendidas em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 20 mM, pH = 8, glicerol a 10%, NaCl a 0,5 M e coleato de sódio a 0,5%) com PMSF (fluoreto de fenil-metilsulfóxido, inibidor de proteases, Sigma) a 0,001% e as paredes celulares destruídas por passagem numa prensa “French press” (3 passagens a 12 000 libras/polegada quadrada).

Para sedimentar as paredes e membranas celulares o extracto foi ultracentrifugado (ultracentrifuga Optima LE-80k, Beckman Coulter, rotor 70 Ti) a 42 000 rpm, durante 45 min. a 4 °C. O sobrenadante contendo a proteína foi precipitado com sulfato de amónio a 35% (p/v), a 4 °C, em agitação lenta até completa dissolução. O precipitado foi centrifugado (centrífuga Beckman Avanti J-25, rotor JA 25-50), a 20 000 rpm, durante 30 min. a 4 °C, e o sedimento ressuspendido em tampão de equilíbrio com PMSF a 0,001%.

A solução foi adsorvida a uma coluna de cromatografia de afinidade contendo 35 mL da resina de sefarose azul (Pharmacia) a 4 °C, previamente equilibrada em tampão de

equilíbrio com 0,001% de PMSF. Para a eluição da proteína, utilizou-se um gradiente de sal (NaCl), tendo todos os tampões PMSF a 0,001%.

A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio até que a absorvância a 280 nm do eluído seja inferior a 0,1. Seguidamente a coluna foi lavada com o tampão de lavagem (Tris-HCl 20 mM, pH = 8, glicerol a 10%, coleato de sódio a 0,5% e NaCl a 1M) até que a absorvância a 280 nm do eluído seja inferior a 0,1. Com o tampão de lavagem as moléculas de proteína que não têm interesse saem da coluna, sendo que a proteína a isolar foi eluída da coluna com o tampão de eluição que possui uma força iónica mais elevada (Tris-HCl 20 mM, pH = 8, glicerol a 10%, coleato de sódio a 1% e NaCl a 1,5 M). À saída da coluna foram colocados tubos de ensaio para recolha e efectuados os espectros de absorção de UV-visível (espectrofotómetro UV-visível, modelo UV2, UNICAM, em células de quartzo, Hellma, Alemanha) de 250 a 600 nm, das fracções de lavagem e eluição, para identificação da solução de proteína em estudo.

O espectro de UV-visível da ferroquelatase revelou uma banda de absorção a 330 nm e dois ombros a 440 nm e 525 nm, sendo o primeiro mais pronunciado que o segundo. Estas bandas de absorção de UV-visível são características do centro de [2Fe-2S].

A solução de proteína de cor avermelhada, num volume de cerca de 30 mL foi concentrada até um volume de 2 mL num sistema de ultrafiltração “Diaflo” (Amicon), equipado com uma membrana YM30 (limite de exclusão de 30kDa, Millipore), com agitação. Seguidamente a proteína precipitada foi removida por centrifugação em tubos de eppendorf, a 13 000 rpm, durante 15 min. a 4 °C (centrífuga 5810R, Eppendorf).

A pureza da proteína foi verificada por gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como apresentado no apêndice III.2 e confirmada uma massa molecular de 42 kDa.

A proteína foi passada por uma coluna de cromatografia de filtração em gel, HPLC (cromatografia líquida de elevada resolução) a 4 °C, para remoção de excesso de NaCl, detergente e possíveis contaminantes.

Para a HPLC (Pharmacia XK 16, com uma resina Superdex 200, pressão limite de 0,4 MPa e um intervalo de fluxo de 1,0 mL/min.), a proteína foi eluída com o tampão Tris-HCl 20 mM, pH = 8, glicerol a 10% e NaCl a 150 mM. A proteína de cor avermelhada recolhida à saída da coluna num volume de cerca de 15 mL foi concentrada num centricon-YM30 (Amicon) até um volume de 2 mL e centrifugada em tubos de eppendorf, a 14 000 rpm, 12

min. a 4 °C (centrífuga 5810R, Eppendorf). Após remoção da proteína precipitada, foi determinada a concentração da ferroquelatase (concentração = 23 µM) pelo método BCA (ácido bicinconínico) [3] e novamente foi confirmada a pureza da proteína obtida por gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Para armazenamento, efectuaram-se alíquotas da proteína que foram conservadas em azoto líquido.

Apêndice III.1 Meios de cultura para o crescimento de bactérias *E. coli* que contêm o plasmídeo pGF42

III.1.1 Composição do meio LB sólido

Meio rico em que as bactérias crescem sem sobre-produzir ferroquelatase.

(Os reagentes usados para a formação dos meios LB sólido e líquido têm grau de pureza p.a., e foram obtidos comercialmente a partir da BD, DIFCO, Sigma e Panreac).

Triptona BACTO - 10 g

Extracto de levedura BACTO - 5 g

NaCl - 10 g

Agar BACTO - 15 g

Adicionar 1000 mL de água destilada e autoclavar a 121 °C

Deixar arrefecer até atingir a temperatura de 50 °C e adicionar 1 mL da solução de ampicilina a 50 mg/mL

Adicionar o meio LB sólido em placas de petri.

III.1.2 Composição do meio LB líquido

Triptona BACTO - 10 g

Extracto de levedura BACTO - 5 g

NaCl - 10 g

Adicionar 1000 mL de água destilada e autoclavar a 121 °C.

III.1.3 Composição do meio com fosfato limitante

(Os reagentes usados para a formação do meio com fosfato limitante têm grau de pureza p.a., e foram obtidos comercialmente a partir da Sigma-Aldrich, Panreac, Pronalab, DIFCO, Riedel-de-Haën e Fluka).

Composição por 8 litros:

MOPS - 67,2 g

Tricina - 6,4 g

NaCl - 23,36 g

KOH - 12,8 g

NH₄Cl - 4,08 g

NaHCO₃ - 6,72 g

VFCA - 12 g

Água destilada - 7,7 L

Autoclavar a 121 °C, deixar arrefecer e adicionar as seguintes soluções anteriormente esterilizadas, para cada litro:

Solução "O" - 2 mL

Solução "P" - 100 µL

Solução "S" - 1 mL

Glucose 20% - 2 mL (esterilizar por filtração com filtro de 0,2 µm de diâmetro de poro e guardar no frigorífico)

Tiamina 0,2% - 500 µL (esterilizar por filtração com filtro de 0,2 µm de diâmetro de poro e guardar à temperatura ambiente)

Ampicilina (50 mg/mL) - 1 mL (esterilizar por filtração com filtro de 0,2 µm de diâmetro de poro e guardar no congelador)

Inóculo - 10 mL

III.1.4 Composição das soluções para o meio com fosfato limitante

III.1.4.1 Composição da solução “O”

Solução contendo ferro, magnésio e oligoelementos.

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 g em 10 mL de HCl concentrado

Água destilada - 10 mL (para uma melhor dissolução)

Solução “T” - 1 mL

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 2,68 g

Completar com água destilada até 50 mL

Esterilizar por filtração com filtro de 0,2 μm de diâmetro de poro e guardar à temperatura ambiente.

III.1.4.2 Composição da solução “T”

Solução de oligoelementos.

Composição por 100 mL:

HCl concentrado - 8 mL

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 18,4 mg

H_3BO_3 - 64 mg

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 40 mg

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 18 mg

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 4 mg

ZnCl_2 - 340 mg

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 605 mg

Completar com água destilada até 100 mL.

III.1.4.3 Composição da solução “P”

Solução 1,0 M em KH_2PO_4 :

KH_2PO_4 - 13,6 g em 100 mL de água destilada

Esterilizar por autoclavagem a 121°C.

III.1.4.4 Composição da solução “S”

Solução 0,276 M em K_2SO_4 :

K_2SO_4 - 4,18 g em 100 mL de água destilada

Esterilizar por autoclavagem a 121 °C.

Apêndice III.2 Determinação da massa molecular e grau de pureza da proteína por electroforese em gel de SDS-PAGE

Com o objectivo de determinar a massa molecular e o grau de pureza da proteína em estudo, de acordo com o método de Laemmli [2], foi efectuado o gel de SDS-PAGE no Mini-PROTEAN Tetra Cell da BIO-RAD, como ilustra a figura A.2.

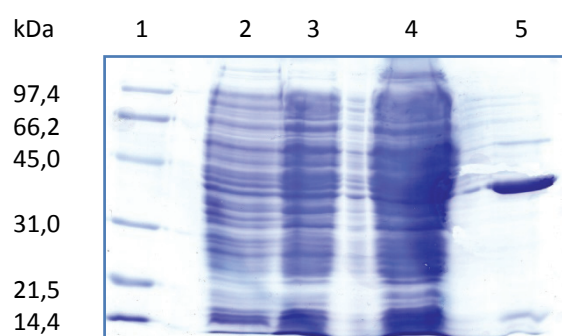


Figura A.2 Gel de SDS-PAGE que ilustra a purificação da ferroquelatase.

Legenda: 1) Padrão de pesos moleculares; 2) proteína após “French press”; 3) proteína no sobrenadante após ultracentrifugação; 4) proteína no sedimento após centrifugação; 5) proteína após purificação na coluna de sefarose azul.

A composição das soluções para a formação do gel de SDS-PAGE a 12% está apresentada na tabela A.1.

Tabela A.1 Composição das soluções para o gel de SDS-PAGE a 12%.

Solução	Reagentes	Quantidade
Gel separador (12%, 5 mL)	H ₂ O destilada	1,7 mL
	Mistura de acrilamida/bisacrilamida a 30% (BIO-RAD)	2 mL
	Trizma base 1,5 M pH 8,8 (Riedel-de-Haën)	1,3 mL
	SDS 10%	0,05 mL
	PSA (persulfato de amônio) 10%	0,05 mL
	TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetrametilene-diamina)	0,002 mL
Gel concentrador (5%, 3 mL)	H ₂ O destilada	2,1 mL
	Mistura de acrilamida/bisacrilamida a 30%	0,5 mL
	Trizma base 1,0 M pH 6,8	0,38 mL
	SDS 10%	0,03 mL
	PSA 10%	0,03 mL
	TEMED (BIO-RAD)	0,003 mL
SDS 10%	SDS (Sigma)	10 g
	H ₂ O destilada	até 100 mL
PSA 10%	Persulfato de amônio (Merck)	10 mg
	H ₂ O destilada	até 10 mL
Tampão de electroforese	Glicina 1,92 M (Riedel-de-Haën)	144,1 g
	Trizma base 0,25 M	30,3 g
	SDS	10 g
	H ₂ O destilada	até 1000 mL
	Diluir 1:10 antes de usar	
Tampão para amostras	Glicerol (Panreac)	2 mL
	β-mercaptoetanol (Merck)	1 mL
	SDS 10%	5 mL
	Solução de gel concentrador	2,5 mL
	Azul de bromofenol (Riedel-de-Haën)	2 mg
Solução corante	Azul de comassie (Merck)	1 g
	Ácido acético (Riedel-de-Haën)	15 mL
	Metanol (Fluka)	90 mL
	H ₂ O destilada	até 200 mL
	Ácido acético	75 mL
Solução descorante	Metanol	450 mL
	H ₂ O destilada	até 1000 mL

Para a determinação da massa molecular da proteína, utilizaram-se proteínas padrão de massa molecular conhecida (BIO-RAD), como apresentado na tabela A.2.

Tabela A.2 Padrões de baixo peso molecular e respectivas massas moleculares para electroforese em gel de SDS-PAGE.

Padrão	Massa Molecular (kDa)
Fosforilase b	97,4
Albumina de soro de bovino	66,2
Ovalbumina	45
Anidrase carbónica	31
Inibidor da tripsina	21,5
Lisoзима	14,4

Estas proteínas foram aplicadas no mesmo gel que a proteína de massa molecular desconhecida, podendo determinar-se a massa molecular da proteína em estudo (42 kDa), através da relação linear entre o Log_{10} da massa molecular das proteínas e as respectivas mobilidades relativas (Rf), como representado na figura A.3, sendo

$$Rf = \frac{\text{distância migrada pela proteína}}{\text{distância migrada pelo gel}}$$

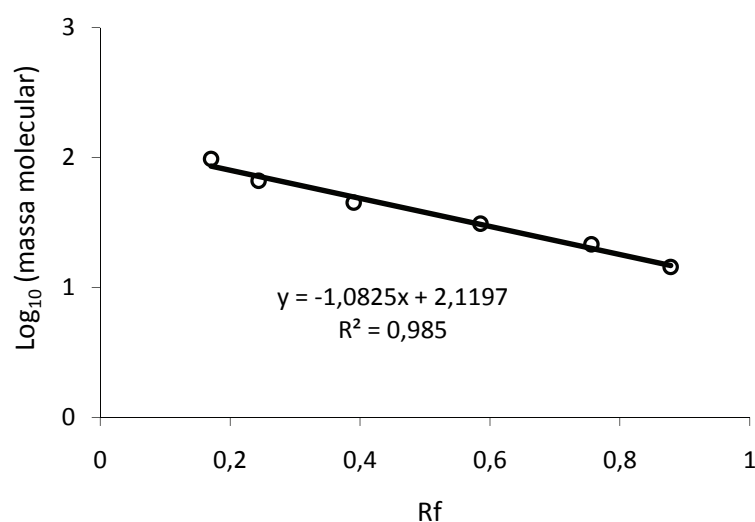


Figura A.3 Log_{10} da massa molecular das proteínas em função das respectivas mobilidades relativas (Rf).

Apêndice IV Síntese de nanopartículas de ouro

A síntese das AuNP foi realizada pelo método de redução de citrato de sódio, descrito por Lee e Meisel em 1982 [4], em que o citrato de sódio é um agente redutor, de revestimento e de estabilização electrostática [5, 6].

Sucintamente, aqueceram-se até à ebulição 250 mL de ácido tetracloroáurico tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) a 1 mM num balão de 500 mL de fundo redondo equipado com um condensador, em agitação vigorosa. Uma vez em refluxo, foi adicionado 25 mL de citrato de tri-sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma) a 38,8 mM e a mistura manteve-se em refluxo durante 15 min. com agitação vigorosa. A solução de AuNP arrefeceu até atingir a temperatura ambiente e foi armazenada no escuro até ser usada.

O material de vidro e o agitador magnético usados na síntese foram previamente imersos em água régia (HCl/HNO_3 3:1 v/v) durante cerca de 12 horas e lavados com água ultra-pura (sistema de água Milli-Q, Millipore, 18,2 MΩ.cm), de forma a impedir que ocorra nucleação durante a síntese, assim como agregação do ouro coloidal [7].

A concentração das nanopartículas de ouro foi determinada pela lei de Lambert-Beer, assumindo que a absorvidade molar calculada para a banda de ressonância plasmónica superficial (SPR) a 526 nm é de $2,33 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [8]. A concentração das AuNP obtida através deste método situa-se entre os 10 - 15 nM. A solução de AuNP foi diluída em água ultra-pura (Milli-Q, Millipore, 18,2 ΩM), para se obterem concentrações inferiores à concentração determinada após a síntese.

A solução de AuNP apresenta um máximo de comprimento de onda da banda de SPR a cerca de 520 nm, exibe cor vermelho escuro e um pH ligeiramente ácido (cerca de 6,3).

Apêndice V Preparação das soluções de citocromo c

O citocromo *c* derivado de coração de cavalo (Horse heart cytochrome *c*, grau de pureza de 99,7%, massa molecular = 12,4 kDa) e o citocromo *c* derivado de levedura de isoforma-1 (Yeast-iso-1-cytochrome *c*, grau de pureza de 86%, massa molecular = 12,6 kDa) foram obtidos comercialmente a partir da Sigma-Aldrich, sem purificação adicional e preparados em tampão fosfato de potássio (Riedel-de-Haën), 20 mM, pH = 7,2. A concentração das soluções de citocromo *c* foi determinada espectroscopicamente usando a absorvidade molar de $29,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a banda α a 551 nm após redução da solução com ditionito de sódio (Sigma).

Apêndice VI Determinação do número teórico de moléculas de citocromo *c* adsorvidas à superfície da AuNP e adsorvidas à superfície da MUA-AuNP

O ouro possui uma estrutura cristalina em que os seus átomos exibem uma estrutura atômica cúbica compacta. Os átomos estão colocados nos vértices de um cubo e nos centros de cada face do cubo, formando uma estrutura designada por cúbica de face centrada - cfc (figura A.4). Num sólido cristalino a porção mais pequena do cristal que conserva as propriedades originais do mesmo, denomina-se por célula unitária [9]. Efectuando um paralelismo com a forma de adsorção da proteína à superfície da AuNP, considerou-se que as proteínas adsorvem segundo a mesma estrutura.

A figura A.4 representa a estrutura cúbica de face centrada, em que as esferas são o Cyt *c*. O quadrado a tracejado representa uma célula unitária que contém dois triângulos rectângulos, em que pelo teorema de Pitágoras $b^2 = a^2 + a^2$, sendo $b = 4r$.

Assim, uma célula unitária é composta por 2 Cyt *c*.

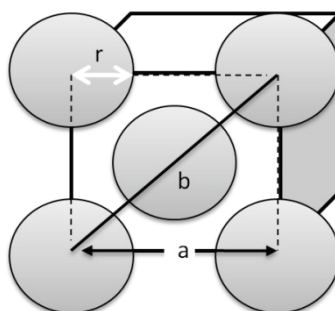


Figura A.4 Representação esquemática de uma estrutura cúbica de face centrada (cfc).

O diâmetro médio determinado por DLS para o HCc em solução foi de $2,5 \pm 0,2$ nm e de $2,7 \pm 0,2$ nm para o YCc. As AuNP em solução apresentaram um d (H) médio de $11,7 \pm 1,6$ nm. Os cálculos efectuados para determinar o número de moléculas de citocromo *c* que adsorvem à superfície da AuNP são apresentados nas tabelas A.3 e A.4.

Tabela A.3 Cálculos para determinação do número de moléculas de HCc ligados à superfície da AuNP.

		<i>d</i> (H) médio (nm)	<i>r</i> (nm)	<i>a</i> (nm)	Área célula unitária (nm ²)	Área superfície AuNP (nm ²)	Nº células unitárias por Cyt <i>c</i>	Nº Cyt <i>c</i> por AuNP
	HCc	2,5	1,25	3,54	12,5			
1ª								
Monocamada	AuNP	11,7	5,9			437	35	70
2ª			5,9 +					
Monocamada	AuNP		2,5			887	71	142
			= 8,4					

Tabela A.4 Cálculos para determinação do número de moléculas de YCc ligados à superfície da AuNP.

		<i>d</i> (H) médio (nm)	<i>r</i> (nm)	<i>a</i> (nm)	Área célula unitária (nm ²)	Área superfície AuNP (nm ²)	Nº células unitárias por Cyt <i>c</i>	Nº Cyt <i>c</i> por AuNP
	YCc	2,7	1,35	3,82	14,6			
1ª								
Monocamada	AuNP	11,7	5,9			437	30	60
2ª			5,9 +					
Monocamada	AuNP		2,7			929	64	128
			= 8,6					

Área da célula unitária = a^2

Área de superfície da AuNP = Área de superfície de uma esfera = $4\pi r^2$

Número de células unitárias por Cyt *c* = Área de superfície da AuNP / Área da célula unitária

Número de Cyt *c* por AuNP = Número de células unitárias x 2 Cyt *c*

Podem adsorver à superfície da AuNP numa primeira camada 70 moléculas de HCc e numa segunda camada 142 moléculas da mesma proteína. Conjuntamente as monocamadas podem conter 212 moléculas de HCc. No que respeita o YCc, podem adsorver

à superfície da AuNP 60 moléculas de YCc numa primeira camada e 128 numa segunda camada, o que totaliza 188 moléculas de YCc no conjunto das duas monocamadas.

O HCc adsorveu à superfície da MUA-AuNP segundo a mesma estrutura, a partir da qual se determinaram o número de moléculas de HCc que podem adsorver à MUA-AuNP (tabela A.5), sendo o d (H) médio determinado por DLS de $2,5 \pm 0,2$ nm para HCc e de $13,5 \pm 1,5$ nm para MUA-AuNP.

Tabela A.5 Cálculos para determinação do número de moléculas de HCc ligados à superfície da MUA-AuNP.

		d (H) médio (nm)	r (nm)	a (nm)	Área célula unitária (nm ²)	Área superfície MUA- AuNP (nm ²)	Nº células unitárias por Cyt c	Nº Cyt c por MUA- AuNP
	HCc	2,5	1,25	3,54	12,5			
1ª	MUA- Monocamada AuNP	13,5	6,75			573	46	92
2ª	MUA- Monocamada AuNP		6,75 + 2,5 = 9,25			1075	86	172

Área da célula unitária = a^2

Área de superfície da MUA-AuNP = Área de superfície de uma esfera = $4\pi r^2$

Número de células unitárias por Cyt c = Área de superfície da MUA-AuNP / Área da célula unitária

Número de Cyt c por MUA-AuNP = Número de células unitárias x 2 Cyt c

Verificou-se que podem adsorver à superfície da MUA-AuNP numa primeira camada 92 moléculas de HCc e numa segunda camada 172 moléculas de proteína.

Apêndice VII Preparação de amostras para análise por Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP)

As amostras de AuNP e MUA-AuNP foram centrifugadas durante 10 min. a 3000 rpm (centrífuga 5810R, Eppendorf), seguido da remoção do sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 300 μ L de água ultra-pura (Milli-Q, Millipore, 18,2 M Ω .cm) e por último ressuspenso em água régia preparada de fresco (HCl/HNO₃ 3:1 v/v) para um volume final de 1 mL. As amostras foram analisadas por ICP em equipamento Horiba Jobin-Yvon.

As medidas foram efectuadas pela Dra. Carla Rodrigues no Laboratório de Análises do REQUIMTE, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Bibliografia

- [1] Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernandez, A.; Penadés, S. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1909-1921.
- [2] Ferreira, G. C. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4396-4400.
- [3] Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.
- [4] Lee, P. C.; Meisel, D. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391-3395.
- [5] Brewer, S. H.; Glomm, W. R.; Johnson, M. C.; Knag, M. K.; Franzen, S. *Langmuir* **2005**, *21*, 9303-9307.
- [6] Kaufman, E. D.; Belyea, J.; Johnson, M. C.; Nicholson, Z. M.; Ricks, J. L.; Shah, P. K.; Bayless, M.; Pettersson, T.; Feldoto, Z.; Blomberg, E.; Claesson, P.; Franzen, S. *Langmuir* **2007**, *23*, 6053-6062.
- [7] Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215-4221.
- [8] Baptista, P.; Doria, G.; Henriques, D.; Pereira, E.; Franco, R. *J. Biotechnol.* **2005**, *119*, 111-117.
- [9] Chang, R. Química; 5ª Edição, McGraw-Hill, Portugal, 1998.