



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

ROMANA PETRY

**INFLUÊNCIA DE POLÍMEROS SINTÉTICOS SOBRE COLOIDES DE SÍLICA:
ESTABILIDADE COLOIDAL E INTERAÇÕES DA NANO-BIO INTERFACE**

FORTALEZA

2017

ROMANA PETRY

**INFLUÊNCIA DE POLÍMEROS SINTÉTICOS SOBRE COLOIDES DE SÍLICA:
ESTABILIDADE COLOIDAL E INTERAÇÕES DA NANO-BIO INTERFACE**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular no Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para colação de grau.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula

Co-orientador: Dr. Diego Stéfani Teodoro
Martinez

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P583i Petry, Romana.

Influência de polímeros sintéticos sobre coloides de sílica: estabilidade coloidal e interações da nano-bio interface / Romana Petry. – 2017.

50 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.

Coorientação: Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez.

1. Nanopartículas de sílica. 2. Estabilidade coloidal. 3. Protein Corona. 4. Forças de depleção. 5. Polímeros.
I. Título.

CDD 661

ROMANA PETRY

**INFLUÊNCIA DE POLÍMEROS SINTÉTICOS SOBRE COLOIDES DE SÍLICA:
ESTABILIDADE COLOIDAL E INTERAÇÕES DA NANO-BIO INTERFACE**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular no Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para colação de grau.

Aprovada em 01 / 12 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por me acompanhar na nova experiência que vivi esse ano. Agradeço por ajudarem me apoiando, incentivando e aconselhando nas minhas decisões e ações durante todo o ano, como também, garantindo um lar tranquilo e acolhedor.

Agradeço ao Dr. Diego Stéfani Martinez e ao Dr. Amauri Jardim de Paula por serem ótimos orientadores, pacientes e respeitosos. Agradeço, por me darem a oportunidade de trabalhar em seus projetos e por sempre estarem disponíveis para ajudar, tirar minhas dúvidas e discutir assuntos científicos.

Agradeço à Coordenação do Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Gilmar, Prof^a Márjory e Prof^a Cristina, por ajudar a tornar possível a realização do estágio supervisionado em Campinas – SP e por sempre atenderem às minhas dúvidas e dificuldades, mesmo à distância.

Agradeço a todos os integrantes do grupo de Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia do LNNano não só por serem ótimos profissionais, mas também, por serem pessoas extremamente divertidas e acolhedores que deixavam os dias de trabalho bem mais leves.

Agradeço à Viviane Macedo, Camila Holanda e ao Thiago Raniere, pelas contribuições essenciais para realização desta Monografia. Como também, agradeço, a todos os integrantes do grupo SolBIN (Solid-Biological Interface) e do Laboratório de Materiais Funcionais Avançados da UFC por serem ótimos colegas de trabalho e amigos.

E por fim, agradeço a todos os meus amigos do curso de Bacharelado de Biotecnologia.

RESUMO

A obtenção de sistemas coloidais estáveis em dispersantes biocompatíveis é imprescindível para aplicação biomédica de nanopartículas. A interação desses materiais com o meio biológico é influenciada tanto pelas características de composição, de superfície e de morfologia do nanomaterial, como também, por suas características coloidais. Quando adicionadas no meio, macromoléculas como polímeros sintéticos podem promover a estabilidade coloidal das nanopartículas em dispersantes com alta força iônica (ex. tampão fosfato - PBS). No entanto, pouco se conhece sobre a influência dessas moléculas sobre as interações entre os nanomateriais e os elementos biológicos básicos, como proteínas e células, os quais estão presentes onde os colóides serão aplicados. Diante disso, nesse trabalho, mostrou-se que os polímeros (i) Pluronic F-127 (PF127), (ii) polietilenoglicol (PEG) com diferentes pesos moleculares – 1500 Da (PEG 1,5k), 12000 Da (PEG 12k) e 35000 Da (PEG 35k) – e (iii) a proteína modelo albumina sérica bovina (BSA), quando adicionados à suspensões de nanopartículas de sílica (SiNPs) em PBS, atuam sobre a estabilidade coloidal dessas através de mecanismos distintos. Apesar de todas as moléculas adsorverem na superfície do material, enquanto a BSA manteve a estabilidade das SiNPs no meio através de mecanismos eletroestéricos, os polímeros PEG e PF127 promoveram o surgimento de forças de depleção entre as partículas. Diante disso, constatou-se que as interações entre polímeros e nanopartículas são de caráter reversível e a superfície do material permanece acessível a proteínas quando esse é incubado em plasma sanguíneo humano, mesmo com altas concentrações de polímeros na suspensão. Por outro lado, a BSA possuiu um maior efeito sobre o perfil da *Protein Corona* das SiNPs, em relação aos polímeros quando presente nas concentrações de 5 e 8% nas suspensões. Os estudos de *Protein Corona* tanto permitiram avaliar os efeitos que os polímeros e a BSA possuem sobre a adsorção das proteínas sobre as superfícies das SiNPs, como complementaram o estudo das interações entre as moléculas estabilizantes com a superfície das nanopartículas.

Palavras-Chave: Nanopartículas de sílica. Polietilenoglicol. Pluronic F-127. Albumina sérica bovina. Estabilidade coloidal. Forças de depleção. *Protein Corona*.

ABSTRACT

To obtain stable colloidal systems in biocompatible dispersants is essential for nanoparticles biomedical application. The interaction of these materials with the biological medium is influenced by their composition, surface, shape and colloidal characteristics. When macromolecules, such as synthetic polymers, are added in the medium, they may promote nanoparticles colloidal stability in dispersants with high ionic strength (i.e. Phosphate Buffer). However, little is known about the influence of these molecules on the interactions between nanomaterials and organism's biological components, such as proteins and cells, which are present where the colloids will be applied. In this work, it was shown that the addition of the polymers (i) PF127, (ii) PEG with different molecular weights – 1500 Da, 12000 Da and 35000 Da - and (iii) the protein bovine serum albumin (BSA), on colloids of silica nanoparticles dispersed in PBS affect on their colloidal stability through different mechanisms. All molecules adsorbed on the material surface, however, while BSA maintained the SiNPs dispersed in the medium by electrosteric stabilization mechanisms, the polymers PEG and PF127 led the occurrence of depletive forces between the particles. Therefore, it was found that the interactions between polymers and nanoparticles are reversible and the material surface remains accessible to proteins when it is incubated in human blood plasma, even with high concentrations of polymers in the medium. On the other hand, BSA had a greater effect on the SiNPs *Protein Corona* profile than polymers, when it was added in concentrations over 5 % on nanoparticles suspensions. The studies of *Protein Corona* allowed to evaluate the effects that the polymers and the BSA have on the protein adsorption on SiNPs surfaces and complemented the studies about the interactions between the stabilizing molecules with the nanoparticles surface.

Keywords: Silica nanoparticles. Bovine serum albumin. Pluronic F-127. Polyethylene glycol. Colloidal stability. Depletion forces. *Protein Corona*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Relação entre identidade sintética e biológica de um nanomaterial com a resposta fisiológica 12
- Figura 2:** **a.** Representação esquemática das componentes da *Protein Corona*. **b.** Procedimento geral para formação da *Protein Corona* em nanopartículas. 14
- Figura 3:** **a.** O potencial DLVO é a soma dos potenciais das forças eletrostáticas (repulsivas) e de Van der Waals (atrativas) **b.** Ilustração do potencial DLVO entre duas esferas em função do aumento da concentração de sais no meio (i → iv). 17
- Figura 4:** Ilustração de modelo de repulsão estérica oriunda da aproximação de cadeias poliméricas ligadas às superfícies de duas esferas. 18
- Figura 5:** Representação ilustrativa de **a.** desestabilização e **b.** estabilização coloidal por depleção. 19
- Figura 6:** **a.** Representação ilustrativa de como é calculada a média aritmética dos valores de pixels das colunas dos géis de eletroforese **b.** Gráfico resultante dos dados retirados. 28
- Figura 7:** **a.** Espectro de absorção de luz da suspensão de SiNPs fluorescentes na faixa de comprimentos de onda do espectro visível. **b)** Imagem de SiNPs adquirida por Microscopia Eletrônica de Varredura 29
- Figura 8:** Acompanhamento fotográfico da estabilidade coloidal das suspensões de SiNPs (500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) em tampão fosfato (10 $\text{mmol}.\text{L}^{-1}$) em conjunto com 0,0, 0,1, 1,0, 5,0 ou 8,0% m/m de polímeros ou BSA durante 144 horas. 31
- Figura 9:** Suspensões de SiNPs (500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) em tampão fosfato (10 $\text{mmol}.\text{L}^{-1}$) em conjunto com 0,0, 0,1, 1,0, 5,0 ou 8,0% m/m de BSA ou PF127 após 144 horas de repouso. 32

Figura 10: Análise do tamanho médio e do índice de polidispersividade das SiNPs ($250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) em tampão fosfato diluído ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) ao longo de 70 min **a.** Sem adição de estabilizantes e **b.** com adição de BSA; PF127; PEG 1,5k; PEG 12k e PEG 35k nas concentrações 0,1; 1,0 e 5% m/m. 32

Figura 11: Medidas de Potencial Zeta de suspensões de SiNPs ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) com Tampão Fosfato diluído ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e diferentes razões de concentração nanopartícula:estabilizante (1:0,2, 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:5 m/m). 35

Figura 12: Análise por SDS-PAGE de proteínas da HC da superfície de SiNPs em suspensão com os polímeros **(I)** PEG, **(II)** PF127 e proteína **(III)** BSA nas concentrações de 0,0, 0,1, 1,0, 5,0 e 8,0% m/m em PBS $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ após incubação com plasma sanguíneo humano 55%. 37

Figura 13: Géis de SDS-PAGE de proteínas da HC da superfície de SiNPs em suspensão com polímeros PEG, PF127 e BSA nas concentrações de 0,0, 0,1, 5,0 e 8,0% m/m em tampão fosfato $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ incubada com PSH 55% 42

Figura 14: *Protein Coronas* de SiNPs incubadas com PSH 20% e polímeros nas concentrações 5 e 8% m/m para volume final de 1 mL. 44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES	9
1.2	NANOBIOTECNOLOGIA: AVANÇOS E DESAFIOS	10
1.3	A NANO-BIO INTERFACE: “BIOMOLECULAR CORONA”	11
1.4	COLOIDES E ESTABILIDADE COLOIDAL	15
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	MATERIAIS:	22
3.2	SÍNTESE:	22
3.3	CARACTERIZAÇÃO:	23
3.4	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE COLOIDAL:	24
3.5	AVALIAÇÃO DA PROTEIN CORONA:	25
3.6	ALGORITMO PARA ANÁLISE DE GÉIS DE ELETROFORESE	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	CARACTERIZAÇÃO:	28
4.2	ESTABILIDADE COLOIDAL:	30
4.3	PROTEIN CORONA	36
5	CONCLUSÃO	45
6	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES

Nas últimas décadas, estudos envolvendo a nanotecnologia e nanomateriais foram realizados em diversas áreas do conhecimento visando soluções tecnológicas e inovadoras em eletrônica, tecnologia da informação, energia, medicina, entre outras. De acordo com a União Européia (2011), os nanomateriais são “materiais de origem natural, acidental ou fabricada que contêm partículas, em um estado não ligado, agregado ou aglomerado, sendo, em número, acima de 50%, com uma ou mais dimensões externas possuindo distribuição de tamanho de 1-100 nm” (EUROPEAN UNION, 2011).

O grande interesse sobre eles surge devido a suas propriedades físicas, químicas e mecânicas que se distinguem dos materiais na macroescala, e dependem da sua composição, tamanho, formato e estrutura cristalina. Por exemplo, nanopartículas podem apresentar ponto de fusão, emissão e absorção de luz, reatividade química, resistência mecânica, condutividade eletrônica, entre muitas outras características distintas de materiais similares na macroescala, e que podem ser vantajosas para diversas aplicações (CAO, 2004).

Inicialmente, as pesquisas em nanotecnologia focaram no desenvolvimento de rotas de produção de nanomateriais que permitissem o controle fino das características e propriedades do produto final. Hoje, eles podem ser sintetizados através de diversos processos, químicos, físicos ou mecânicos, nos quais é possível o controle de características como química de superfície, tamanho e formato, a depender de sua composição. Sendo assim, a habilidade de sintetizá-los e manipulá-los possibilitou o design racional e a combinação de diferentes propriedades em um mesmo nanomaterial, o que motivou a aplicação desses materiais em diversos setores.

Atualmente, nanopartículas já são empregadas em produtos comerciais como embalagens para alimentos (ex. nanopartículas de prata), dispositivos eletrônicos (ex. nanotubos de carbono e grafeno), cosméticos (ex. nanopartículas poliméricas), entre outros (CONTADO, 2015; RAJ *et al.*, 2012). Em medicina, as nanopartículas apresentam-se como materiais promissores para aplicação em diagnóstico como agentes de contraste ou componentes de biossensores e em *drug-delivery* como veículos para drogas, principalmente quimioterápicos (PELAZ *et al.*, 2017).

Entretanto, apesar da gama de aplicações para as quais os nanomateriais podem ser destinados, a nanotecnologia ainda possui muitos aspectos a serem compreendidos. Alguns desafios compreendem o entendimento das interações dos nanomateriais com entidades biológicas (ex. proteínas, células, ácidos nucleicos, entre outros), e o impacto que esses possuem sobre o ambiente em que são inseridos (MARTINEZ; ALVES, 2013; BERGESE, PAOLO; HAMAD-SCHIFFERLI, 2013).

1.2 NANOBIOTECNOLOGIA: AVANÇOS E DESAFIOS

A aplicação de ferramentas nanotecnológicas no desenvolvimento de produtos biotecnológicos se contextualiza na nanobiotecnologia. A possibilidade de manipular materiais quanto às suas características funcionais, estruturais e superficiais na nanoescala trouxe grandes avanços para a biotecnologia. A intersecção de ferramentas desses dois domínios vem causando grandes impactos sobre as ciências biológicas e a medicina. Por exemplo, a nanobiotecnologia tem acelerado o desenvolvimento de tecnologias para biologia sintética, sequenciamento de DNA, métodos de diagnósticos, combate à doenças e patógenos, entre outros (GAZIT, E. ; MITRAKI, 2013).

Diante disso, as nanopartículas são materiais chave nas pesquisas envolvendo nanobiotecnologia. Uma vez que estão na mesma escala de tamanho de constituintes importantes dos seres vivos, como ácidos nucleicos (Fita dupla de DNA $\approx 2,5$ nm), proteínas (Raio hidrodinâmico da Albumina $\approx 3,37 \pm 0,03$ nm) e membranas celulares, elas são capazes de acessar vários locais dos sistemas vivos e interagir de maneira eficaz com as biomoléculas e estruturas celulares. Além disso, a possibilidade de funcionalização das superfícies desses materiais (ex. utilizando biomoléculas) atribui especificidade às interações entre eles e os sistemas biológicos. Dessa forma, o design racional de nanomateriais tem sido largamente utilizado como estratégia para desenvolvimento de tecnologias como biossensores mais eficazes, e sistemas complexos de *drug-delivery* (JEWETT; PATOLSKY, 2013; JHA *et al.*, 2014).

As propriedades das nanopartículas e seus efeitos sobre os sistemas biológicos estão fortemente relacionadas ao tamanho, formato e química de superfície das partículas e pequenas alterações nessas características podem afetar significativamente a funcionalidade desses materiais (BANTZ *et al.*, 2014). Sendo assim, a aplicação biológica de nanomateriais exige protocolos de síntese reprodutíveis que gerem nanopartículas biocompatíveis e estáveis nos meios onde serão aplicadas. Ou seja, elas devem possuir uma distribuição de tamanho uniforme

e não podem sofrer agregação ou perder suas propriedades nas condições de força iônica e pH do meio em que serão inseridas. Hoje, a produção de nanopartículas que permaneçam estáveis em meios com alta força iônica, como fluidos biológicos, ainda é um dos principais gargalos para aplicação biológica dos nanomateriais.

Outro problema enfrentado nessa área é a necessidade de maior compreensão sobre o destino desses materiais nos organismos vivos, como também sobre o papel das biomoléculas que interagem com eles no meio. Quando os nanomateriais são inseridos no meio biológico, as biomoléculas ali presentes (ex. proteínas) tendem a recobrir a sua superfície e essa camada influencia nas propriedades do nanomaterial e no seu destino final. Diante disso, muitas nanopartículas podem perder sua funcionalidade e mesmo serem rapidamente eliminadas a depender das moléculas presentes nessa camada.

Portanto, antes da aplicação de novos nanomateriais, principalmente na área biomédica, estudos aprofundados sobre o comportamento e os efeitos desses no meio em que serão inseridos é de extrema importância. Alguns aspectos a serem analisados são: a estabilidade coloidal, a toxicidade celular, os locais acessados no organismo, as vias de eliminação, a manutenção das propriedades do material, a influência das biomoléculas do meio sobre o material, entre muitos outros. Nesse contexto, a área da nanotecnologia que estuda mais sistematicamente esses efeitos é denominada de nanotoxicologia (MARTINEZ; ALVES, 2013; DURÁN; GUTERRES; ALVES, 2014).

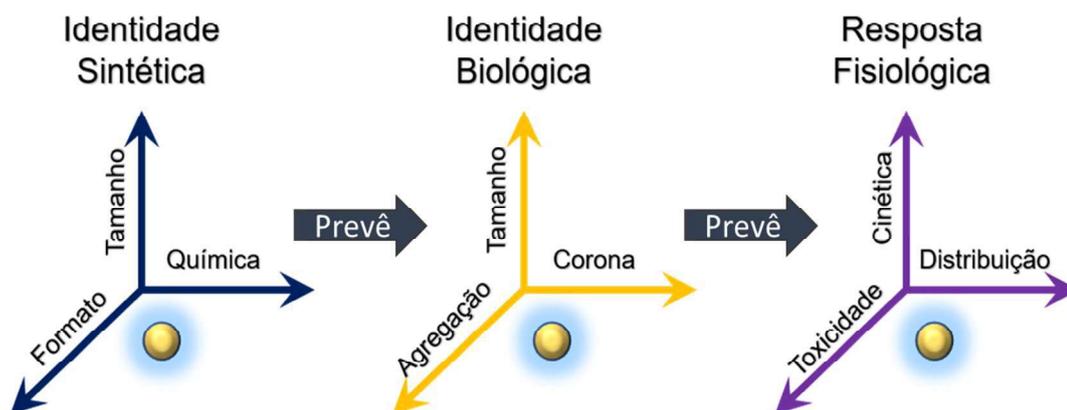
1.3 A NANO-BIO INTERFACE: “BIOMOLECULAR CORONA”

Quando nanopartículas entram em contato com fluidos biológicos, devido à alta energia de superfície desses materiais, as biomoléculas presentes no meio, principalmente proteínas, tendem a rapidamente recobri-las formando a chamada *Protein Corona*. Após a formação dessa camada, o nanomaterial ganha uma nova identidade biológica, agora dependente da composição da estrutura proteica presente na sua superfície. Portanto, o destino dos nanomateriais nos organismos, e as respostas fisiológicas desencadeadas (ex. internalização celular, citotoxicidade, inflamação ou respostas alérgicas) estão diretamente relacionadas à composição da *Protein Corona* (MONOPOLI *et al.*, 2012).

Por sua vez, os tipos de proteínas que interagem com a superfície das nanopartículas estão relacionados às características do material, principalmente curvatura, topografia e química de superfície. Além disso, a concentração relativa de cada proteína no meio e o grau de afinidade que elas possuem à superfície do material também ditarão a composição final da corona. Diante

disso, o conhecimento aprofundado sobre os fatores que governam a estrutura e composição da *Protein Corona* e a relação deles com as características dos nanomateriais é importante para previsão das respostas biológicas de um dado material, e para guiar o design de nanopartículas de acordo com suas aplicações (Figura 1) (TREUEL *et al.*, 2015).

Figura 1:Relação entre identidade sintética e biológica de um nanomaterial com a resposta fisiológica



Fonte: Adaptada de Walkey; Chan, 2012

As biomoléculas presentes no meio biológico, em sua maioria proteínas, migram para superfície das nanopartículas por difusão ou gradiente de potencial. Uma vez na superfície do nanomaterial, caso seja termodinamicamente favorável (ΔG de adsorção < 0), elas se mantêm adsorvidas através de diferentes mecanismos como, por exemplo, interações eletroestáticas, de Van Der Waals e hidrofóbicas, bem como ligações de hidrogênio e empilhamento π (MAHMOUDI *et al.*, 2016). Além das interações nanopartícula-proteína, a corona também apresenta interações do tipo proteína-proteína, as quais podem ser do tipo específicas (ex. interações entre domínios complementares) ou não (ex. interações entre domínios carregados ou hidrofóbicos).

A *Protein Corona* é dinâmica, ou seja, as proteínas da superfície dos materiais estão em processo constante de adsorção e dessorção. Sendo assim, sua composição proteica também está sujeita a mudanças ao longo do tempo e de acordo com as alterações do ambiente ao redor das partículas. Desse modo, a estabilidade de cada proteína na superfície do material depende da energia de ligação (ΔG) envolvida no seu processo de adsorção (WALKEY; CHAN, 2012).

O processo de formação da *Protein Corona* pode ser dividido em dois estágios. O primeiro, logo após a inserção dos nanomateriais no fluido biológico, no qual as proteínas mais abundantes do meio rapidamente compõem a corona, e o segundo, quando essas proteínas são substituídas por aquelas que possuem mais afinidade à superfície do material, mesmo estando

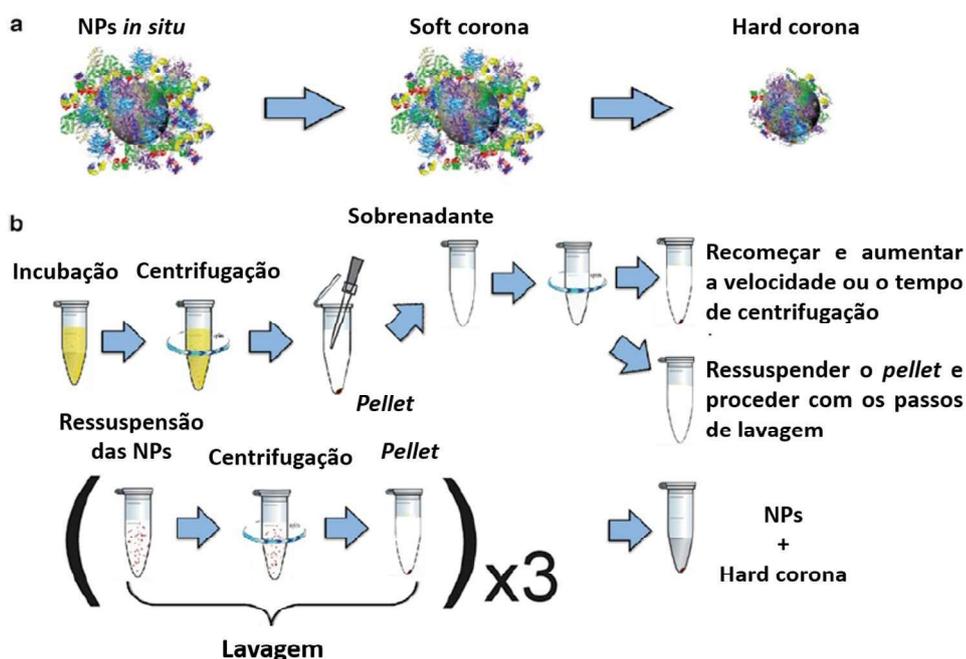
em menor concentração. Desse modo, a partir do segundo estágio, as moléculas que atingem a superfície das partículas o fazem por meio de competição com as proteínas já adsorvidas. Essa mudança na composição da corona ao longo do tempo devido ao processo de dessorção e adsorção de proteínas é conhecido como “Efeito Vroman” (DOCTER *et al.*, 2015).

Diante disso, na literatura é aceito que a *Protein Corona* é composta por duas partes: a primeira formada pelas proteínas que estão fortemente ligadas, denominada *hard corona* (HC), cuja composição está sujeita a poucas alterações após atingir seu equilíbrio e o ambiente ao redor das partículas permanecer inalterado; e a segunda, denominada *soft corona* (SC), que é constituída de proteínas com menor energia de ligação e cuja composição é mais dinâmica em relação à HC (Figura 2a) (WOLFRAM *et al.*, 2014). Nesse contexto, existe a hipótese de que HC é formada pelas proteínas que estão diretamente ligadas a superfície do material, enquanto a SC pelas proteínas que interagem reversivelmente com a HC. No entanto, não há evidências suficientes na literatura para confirmar esse fato, e moléculas de ambas as coronas podem estar adsorvidas diretamente na superfície do material.

Por apresentar maior estabilidade, a composição da HC possui uma relação mais direta com as características da superfície e com identidade biológica dos nanomateriais quando comparada com a SC. Esta, por sua vez, possui cinética de adsorção e dessorção de moléculas mais dinâmica, e é rapidamente modificada ao longo da movimentação das nanopartículas no ambiente. Sendo assim, acredita-se que a HC é a principal mediadora das interações do nanomaterial com os diversos componentes dos sistemas biológicos e, portanto, possui mais enfoque nas pesquisas envolvendo *Protein Corona*. (FOROOZANDEH; AZIZ, 2015; MONOPOLI *et al.*, 2012; WALKEY; CHAN, 2012).

A maioria dos estudos de *Protein Corona* são realizados *in vitro*, utilizando-se principalmente plasma sanguíneo como fluido biológico. Nessas condições, o processo de formação da corona e sua composição final são fortemente dependentes dos parâmetros experimentais como, por exemplo, temperatura, agitação, concentração proteica, processos de separação das nanopartículas do meio, tempo de incubação, entre outras (MONOPOLI *et al.*, 2011; PISANI *et al.*, 2017). Além disso, como não há mudanças na composição proteica no ambiente ao redor das nanopartículas, como ocorre *in vivo*, a estrutura da HC é mais estável e atinge um equilíbrio ao longo do tempo. Ou seja, apesar de ainda ocorrer fluxo de moléculas entre a superfície do material e o meio, não há mais alteração dos tipos de proteínas que adsorvem no nanomaterial (HADJIDEMETRIOU; KOSTARELOS, 2017; MONOPOLI *et al.*, 2011; TENZER *et al.*, 2013).

Figura 2: a. Representação esquemática das componentes da *Protein Corona*. b. Procedimento geral para formação da *Protein Corona* em nanopartículas.



Fonte: Adaptada de Bergese, Paolo; Hamad-Schifferli, 2013

Diante disso, os estudos de *Protein Corona in vitro* são especialmente importantes para avaliar como as características dos nanomateriais (ex. topografia e química de superfície) e das suas dispersões (ex. estado coloidal e presença de estabilizantes) afetam a estrutura final da HC. Entretanto, esses resultados não são, por si só, definitivos para previsão das interações e destinos finais desses materiais *in vivo*, visto que, não são capazes de simular a variedade de moléculas e compartimentos acessados por eles nos organismos (HADJIDEMETRIOU; KOSTARELOS, 2017).

Sendo assim, o procedimento geral para obtenção da HC de nanomateriais *in vitro* consiste em três passos básicos (Figura 2b):

- Preparação do meio biológico em que o nanomaterial será testado, o qual está relacionado com a aplicação para que ele é destinado.
- Incubação do nanomaterial com o fluido biológico.
- Separação do excesso proteico (proteínas livres ou da SC) da superfície do material.

Para compreender a formação da *Protein Corona* na superfície do nanomaterial e o impacto dessa sobre suas propriedades é importante que ele esteja bem caracterizado quanto às propriedades físico-químicas e quanto a estabilidade de suas dispersões, uma vez que a estrutura final da corona refletirá essas características. Portanto, após a formação da *Protein Corona*, os nanomateriais são novamente caracterizados quanto suas propriedades superficiais, sua

distribuição de tamanho, sua estabilidade no meio e/ou quanto suas propriedades específicas (ex. fluorescência) (BERGESE, PAOLO; HAMAD-SCHIFFERLI, 2013).

A *Protein Corona* é caracterizada utilizando-se métodos diretos e/ou indiretos. Os métodos diretos analisam as características das proteínas adsorvidas no material, por exemplo, quanto a quantidade, ao tipo de proteína, a mudanças de conformação, e incluem técnicas como Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), Espectrometria de Massas, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Dicroísmo Circular, entre outras. Os indiretos consistem em técnicas para análise de características das nanopartículas que indiretamente revelam informações sobre a *Protein Corona* como, por exemplo, carga superficial, tamanho de partícula, absorvância, fluorescência, os quais podem ser avaliados por espectrofotometria UV-VIS, Centrifugação diferencial, Espalhamento de Luz Dinâmico, Potencial Zeta, entre outras (CARRILLO-CARRION; CARRIL; PARAK, 2017).

1.4 COLOIDES E ESTABILIDADE COLOIDAL

A maioria dos nanomateriais são utilizados na forma coloidal, na qual estão dispersos em meios líquidos ou gasosos compatíveis com suas aplicações. O estado coloidal das nanopartículas possui grande influência em suas propriedades. Quando estão individualizadas ou agregadas, as nanopartículas possuem, por exemplo, tamanho, formato e área superficial distintos, o que afeta parâmetros como absorção de luz, emissão de fluorescência, reatividade química, entre outras características do nanomaterial.

Um dos principais requisitos para aplicação biotecnológica de nanopartículas é a obtenção de dispersões estáveis em meios biocompatíveis, ou seja, com composição, força iônica e pH adequados para interação com fluidos e sistemas biológicos. Entretanto, devido principalmente à alta força iônica, as nanopartículas tendem a agregar e sedimentar nesses meios, resultando na modificação das suas propriedades e, principalmente, das suas interações com os sistemas biológicos. Por exemplo, após agregação, as nanopartículas podem apresentar internalização celular, perfil hemolítico e/ou toxicidade diferenciados (HUSSAIN *et al.*, 2015; MAHMOUDI *et al.*, 2014; ZOOK *et al.*, 2011).

A estabilidade coloidal (ou comportamento de fase) de suspensões é ditada pelo balanço de forças, atrativas ou repulsivas, que atuam entre as nanopartículas. Dentre as forças mais importantes, em sistemas aquosos, estão: as de Van der Waals, as eletrostáticas, as estéricas e as depletivas (HENK; TUINIER, 2011).

As forças de Van de Waals e as eletroestáticas são ambas consideradas pela teoria desenvolvida por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (DLVO) para prever o comportamento de fase de coloides que possuem apenas um componente.

As forças de Van de Waals consistem em forças atrativas entre todos os átomos de duas partículas, originadas de oscilações entre as suas nuvens eletrônicas. Essas oscilações formam momentos de dipolos quando elas se aproximam e o potencial da atração (W_{vdW}) é fortemente dependente do tamanho das partículas e da distância entre elas, assim:

$$W_{vdW} = -\frac{A}{6} f(h/R) \quad (1)$$

onde, A é a constante de Hamaker, h é a distância entre as partículas e R o raio das partículas. Dessa forma, quanto mais próximas, mais forte é a atração entre as partículas.

A segunda força, eletroestática, também chamada de interação entre a dupla-camada, ocorre em coloides contendo partículas carregadas no meio. Ela consiste na força repulsiva oriunda da aproximação da camada de contra-íons adsorvidos nas superfícies das partículas, devido às cargas semelhantes e a densidade da camada iônica.

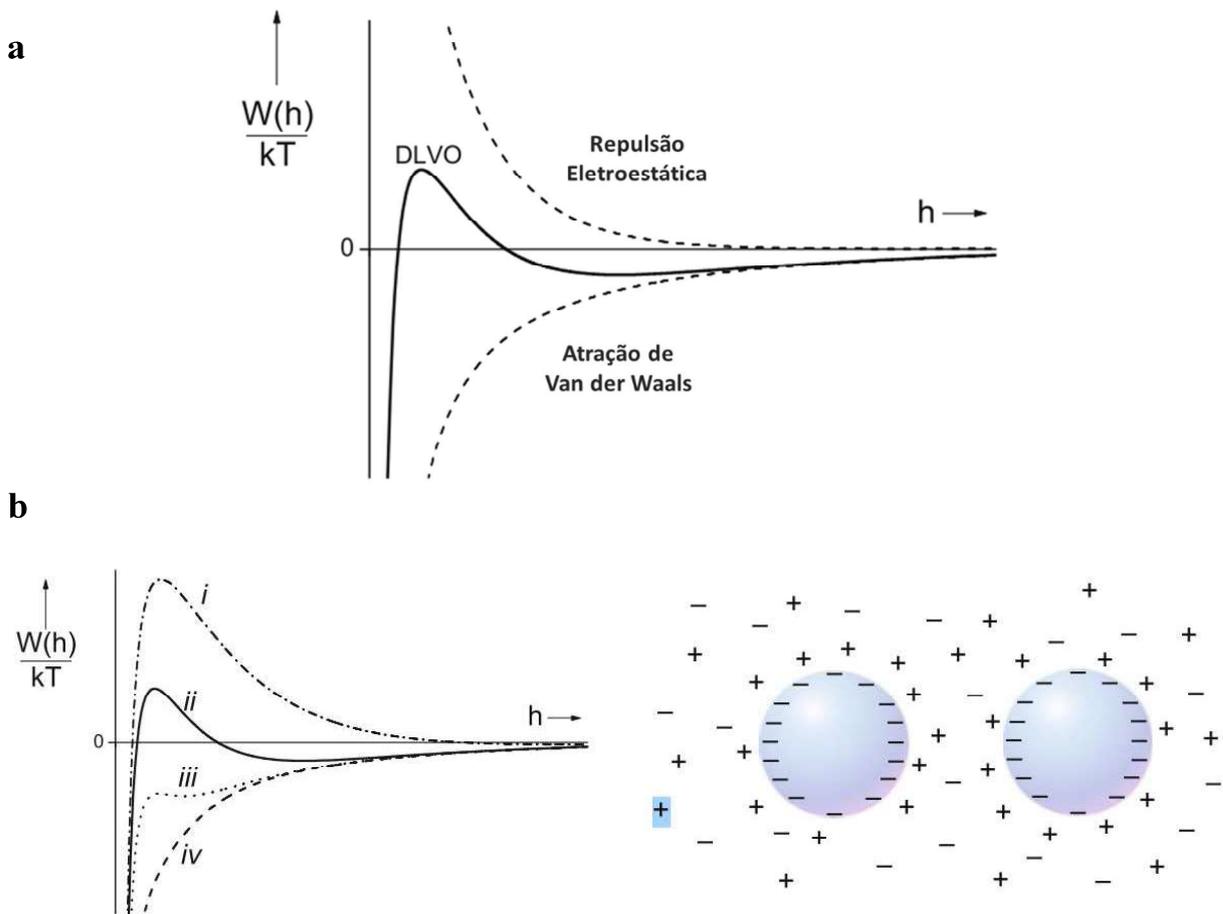
O potencial da repulsão (W_{DR}) é dependente da concentração iônica do meio, a qual influencia a carga das partículas e a espessura da dupla camada de íons ao redor das mesmas. Diante disso, temos que:

$$W_{DR}(h) = B \frac{R}{\lambda_B} \exp(-h/\lambda_D) \quad (2)$$

Onde, λ_B é o comprimento de Bjerrum e λ_D é comprimento de Debye, B é a densidade de carga, ou o potencial, da superfície, h é a distância entre as partículas e R o raio das partículas. λ_B e λ_D levam em consideração as distâncias em que as cargas elementares das partículas começam a interagir e a força repulsiva se torna relevante, respectivamente.

Sendo assim, de acordo a teoria DLVO, para que um coloide seja estável, as forças repulsivas eletroestáticas entre partículas devem superar as forças atrativas de Van der Waals (**Figura 3a**). O balanço entre essas forças irá depender de fatores como: tamanho e propriedades dielétricas das partículas, força iônica e constante dielétrica do meio e densidade eletrônica da dupla-camada. Por exemplo, para um determinado potencial de Van der Waals, o potencial DLVO é alterado de acordo com a concentração de íons do meio (Figura 3b).

Figura 3: a. O potencial DLVO é a soma dos potenciais das forças eletrostáticas (repulsivas) e de Van der Waals (atrativas) b. Ilustração do potencial DLVO entre duas esferas em função do aumento da concentração de sais no meio (i → iv).



Fonte: Adaptada de Henk, N. W. L.; Tuinier, R., 2011

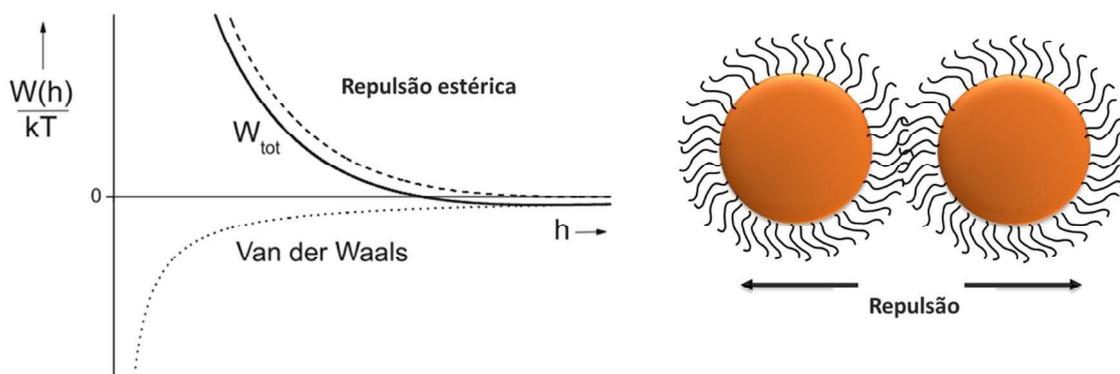
Entretanto, para colóides que possuem mais de um componente, com propriedades físico-químicas distintas (ex. nanopartículas em misturas poliméricas ou proteicas), a teoria DLVO não é suficiente para explicar o comportamento de fases (BOSTRÖM; WILLIAMS; NINHAM, 2001).

Normalmente, para aplicação biotecnológica de nanomateriais a presença de grupos carregados na superfície não é suficiente para garantir a estabilização coloidal dos materiais, uma vez que os meios biológicos possuem alta força iônica. Portanto, algumas estratégias para evitar a agregação do material utilizam metodologias como funcionalização química da superfície do material com moléculas orgânicas ou cadeias poliméricas, ou adição de agentes estabilizantes no meio dispersante, como polímeros sintéticos. A adição de novos componentes no sistema leva ao surgimento de novos tipos de interações e mecanismos de estabilização coloidal como, por exemplo, as forças estéricas e depletivas. Essas passam então a atuar sobre o comportamento de fases do coloide (XING; HUA; NGAI, 2015).

Nesse contexto, quando polímeros são adicionados em um sistema coloidal eles interferem no equilíbrio de forças da suspensão, e o que determina se haverá estabilização ou não das partículas presentes são: as características do solvente; a composição e estrutura dos polímeros e das partículas; as concentrações dos componentes, e os tipos de interação entre eles.

Polímeros adsorvidos ou ligados na superfície das partículas atuam estabilizando-as estericamente, quando recobrem toda a sua superfície e estão em um solvente favorável (Figura 4). Nesse caso, parte das cadeias poliméricas da superfície ficam livres no solvente formando uma camada ao redor das partículas. Desse modo, quando elas se aproximam, a energia livre do sistema aumenta devido à aproximação das cadeias, as quais passam a competir pelo mesmo volume de solvente, gerando uma força repulsiva entre as partículas.

Figura 4: Ilustração de modelo de repulsão estérica oriunda da aproximação de cadeias poliméricas ligadas às superfícies de duas esferas.

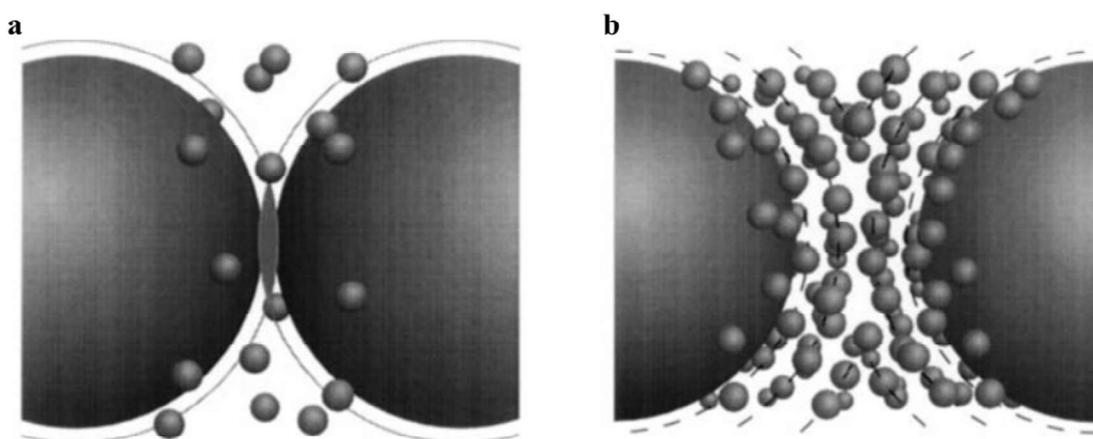


Fonte: Modificada de Henk, N. W. L.; Tuinier, R., 2011

Por outro lado, polímeros não adsorvidos às partículas são mais conhecidos por instabilizar o coloide quando adicionados no sistema em pequenas concentrações. Por não interagirem com a superfície das partículas, uma camada de solvente próxima à essa torna-se inacessível pelas cadeias poliméricas, caracterizando o chamado volume morto. Nesse contexto, quando as partículas se aproximam no meio, as camadas de volume morto se sobrepõem e um gradiente osmótico entre essa camada de sobreposição e o meio externo se forma, liderando uma força atrativa (XING; HUA; NGAI, 2015). Além disso, essa sobreposição resulta na disponibilização de um volume de solvente maior para as cadeias poliméricas, o que leva ao aumento de entropia no sistema e diminuição da energia livre (Figura 5a). Dessa forma, a agregação das partículas é favorável e as forças predominantes no sistema são as forças de depleção atrativas. Esse fenômeno foi inicialmente descrito pelo modelo de Asakura-Oosawa (OOSAWA; ASAKURA, 1954).

Nesse contexto, foi observado que quando a quantidade de polímero em solução é aumentada a suspensão pode novamente ser estabilizada. No entanto, o mecanismo de estabilização ainda está em processo de elucidação. Acredita-se que os polímeros podem formar camadas ao redor das partículas e dificultar a aproximação das mesmas (Figura 5b). Porém, essa explicação não é adequada para suspensões de nanopartículas, pois essas estão na mesma escala de tamanho que as cadeias poliméricas (KIM *et al.*, 2015). No entanto, é certo que aumento da quantidade de polímero no meio aumenta a barreira energética que evita a agregação das nanopartículas e as forças que atuam no sistema são caracterizadas como forças de depleção repulsivas. Os processos de desestabilização e estabilização de coloides por polímeros livres no meio é dependente de características como peso molecular, conformação e concentração desses materiais. Além disso, também é influenciado pelas características das partículas, como tamanho e formato. (SEMENOV; SHVETS, 2015; ZEMB; KRALCHEVSKY, 2015)

Figura 5: Representação ilustrativa de **a.** desestabilização e **b.** estabilização coloidal por depleção.



Fonte: Crocker *et al.*, 1999

As modificações realizadas tanto na superfície das nanopartículas quanto na formulação do meio em que se encontram geram impactos sobre suas funcionalidades e propriedades, consequentemente sobre suas interações com o meio biológico. Diante disso, as modificações da superfície desses materiais, como a adsorção ou ligação de moléculas, nem sempre são favoráveis à sua aplicação de interesse. Nesse contexto, a estabilização de coloides com o uso de polímeros não adsorventes tem sido muito estudada, uma vez que devido às forças depleativas repulsivas, as partículas permanecem dispersas com a superfície acessível a interações com outras moléculas. Entretanto, esse mecanismo de estabilização é de difícil detecção, pois envolve fenômenos entrópicos e forças difíceis de serem mensuradas experimentalmente (KIM *et al.*, 2015; LANG *et al.*, 2013; ZHANG; SERVOS; LIU, 2012).

Diante disso, a identificação dos mecanismos de estabilização exercidos por macromoléculas em um sistema coloidal não é simples, pois no mesmo sistema mais de um tipo de mecanismo pode contribuir para a dispersão das partículas e a extensão da contribuição de cada um é de difícil análise (LANG *et al.*, 2013).

A estabilidade coloidal de nanopartículas pode ser avaliada de diferentes formas como, por exemplo, apenas observando-se o tempo que o material leva para precipitar ou utilizando técnicas que detectam mudanças em propriedades como tamanho e carga superficial de partícula. Normalmente, vários métodos são combinados para caracterizá-la da melhor maneira e em relação a diferentes parâmetros como tempo, meio de dispersão, concentração e tipo de aditivos, funcionalização superficial, entre outros.

Dessa maneira, as técnicas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Espalhamento de Luz Eletroforético (Potencial Zeta) estão dentre as mais acessíveis para avaliar, respectivamente, tamanho e carga superficial de nanopartículas. Por DLS mede-se o diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas correlacionando o tamanho com a velocidade do movimento browniano das partículas utilizando a relação de Stokes-Einstein. Dessa forma, a cada medida, obtém-se o diâmetro hidrodinâmico médio, a distribuição de tamanhos e o índice de polidispersividade (PDI) do coloide. Esse último parâmetro reflete a variância da distribuição de tamanhos da amostra, sendo que distribuições com PDI entre 0.1 e 0.4 consideradas monodispersas. Por outro lado, o Potencial Zeta consiste na carga líquida das nanopartículas levando em consideração a camada de íons adsorvidos que se movem junto com elas no meio. Esse valor é calculado a partir da relação entre a carga superficial e a mobilidade da nanopartícula sob influência de um campo elétrico. Ao final dessa medida, obtém-se um valor médio de Potencial Zeta para um nanomaterial.

Nesse contexto, ao avaliar-se em conjunto o tempo de sedimentação, a carga superficial, o diâmetro hidrodinâmico e o PDI de suspensões de nanopartículas em função do meio dispersante e da concentração de diferentes aditivos (ex. polímeros estabilizantes) é possível verificar a influência desses parâmetros sobre a estabilidade coloidal, como também inferir sobre as interações que ocorrem entre as nanopartículas e outros componentes do sistema. Por exemplo, a adsorção de moléculas não carregadas na superfície das partículas causa a diminuição, em módulo, do valor de potencial zeta e o aumento do diâmetro hidrodinâmico. Unindo essas informações é possível sugerir sobre mecanismos de estabilização coloidal atuantes nas dispersões.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos de estabilidade coloidal manifestados pelos polímeros PEG, PF127, e pela proteína modelo BSA em suspensões de nanopartículas de sílica (SiNPs), dispersas em meio fisiológico (PBS), e a influência desses sobre as interações entre nanopartículas e biomoléculas, analisando os seus efeitos sobre a formação da *Protein Corona* após a interação do nanomaterial com plasma sanguíneo humano (PSH).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterização das SiNPs quanto a absorção de luz, tamanho hidrodinâmico, carga superficial e morfologia pelas técnicas de Espectrofotometria UV-Visível, DLS, Potencial Zeta e Microscopia Eletrônica de Varredura, respectivamente.

Avaliação da estabilidade coloidal das nanopartículas em meio biocompatível (PBS 10 mmol.L⁻¹) com a presença de diferentes concentrações dos polímeros: polietileno glicol 1500Da (PEG 1,5k), 12000 Da (PEG 12k) e 35000Da (PEG 35k), Pluronic F-127 (PF127) e da proteína Albumina Bovina (BSA).

Caracterização da estabilidade coloidal e das interações superficiais entre nanopartículas e estabilizantes (polímeros e proteínas) a partir das técnicas de DLS e Potencial Zeta, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern).

Análise do perfil proteico da corona formada na superfície das SiNPs por 1D SDS-PAGE após incubação das suspensões de nanopartículas com polímeros (PEG ou PF127) ou BSA, em plasma humano.

Desenvolvimento de algoritmo para transformação do perfil de bandas proteicas dos géis de SDS-PAGE, corados com *Coomassie Brilliant Blue*, em gráficos de peso molecular x intensidade utilizando o software *Wolfram Mathematica*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS:

O corante fluorescente Isotiocianato de Fluorascéina (FITC), os silanos Tetraetilortossilano (TEOS) e (3-Aminopropil)trimetoxisilano (APTMS), os tabletes de tampão fosfato salino, bem como os polímeros Pluronic F-127 e PEG com diferentes pesos moleculares (1,5k, 12k e 35k Da), e a proteína BSA liofilizada foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Estados Unidos). O tampão de amostra (*Loading Buffer*) e o padrão de peso molecular (11 – 245 kDa) para SDS-PAGE foram adquiridos da Biolabs.Inc (Inglaterra), e os reagentes para os géis de eletroforese, acrilamina, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sódio e Tris-Base foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). O Plasma Sanguíneo Humano foi obtido em bolsas plásticas adequadas a partir da distribuição de fracionados de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina da Unicamp (Campinas – SP), mediante autorização.

3.2 SÍNTESE:

As SiNPs foram sintetizadas a partir do método de Stöber modificado para obtenção de núcleos (*cores*) fluorescentes, a partir da condensação de moléculas de FITC nos primeiros núcleos formados na etapa de condensação das partículas (OW *et al.*, 2005; STÖBER; FINK; BOHN, 1968; VAN BLAADEREN; VRIJ, 1993). Para isso, primeiro dissolveu-se 3 mg de FITC em 3 mL de etanol absoluto, e em seguida adicionou-se 3,2 µL de APTMS. A mistura foi gentilmente homogeneizada e deixada em repouso por uma hora a temperatura ambiente. Então, 7 mL de etanol absoluto, seguidos de 800 µL de TEOS e 800 µL de Hidróxido de Amônio (28 – 30%) foram adicionados no mesmo frasco e a mistura foi mantida sob agitação por 2 h a 60 °C (± 2). Para interromper o crescimento das partículas e remover os reagentes residuais, a suspensão foi centrifugada por 40 min a 16000 rcf e 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as nanopartículas ressuspensas em etanol absoluto. Esse processo foi repetido três vezes para retirada dos resíduos de reação. Cada reação de síntese possui um volume final de 10 mL. Para a suspensão estoque utilizada nos experimentos, foram realizadas quatro sínteses iguais que ao final foram misturadas. As nanopartículas foram mantidas armazenadas em etanol absoluto e suspensões estoque em água deionizada foram feitas apenas para a realização dos experimentos. Quando em água, a concentração das suspensões foi determinada por termogravimetria.

3.3 CARACTERIZAÇÃO:

As SiNPs suspensas em etanol foram primeiramente redispersas em água deionizada para então serem caracterizadas quanto a absorção de luz, tamanho hidrodinâmico, carga superficial e morfologia. A troca de dispersantes foi realizada por meio da centrifugação da suspensão em etanol por 40 min a 14000 rpm e 4 °C, descarte do sobrenadante e redispersão das nanopartículas com água deionizada. O procedimento foi repetido três vezes para completa retirada do etanol.

O espectro de absorção da suspensão de SiNPs em água deionizada foi realizado utilizando um leitor de placas UV-Vísivel (Thermo Scientific). Para a leitura, foram adicionadas triplicatas de 100 µL de suspensão de nanopartículas com concentração de 1 mg.mL⁻¹ em uma placa de 96 poços, e como branco foi utilizado 100 µL de água deionizada também em triplicata. A análise compreendeu a faixa de comprimentos de onda do espectro visível (380 – 760 nm). Para a construção do espectro resultante, foi utilizada a média dos valores de absorção de luz da suspensão, subtraída da média de absorção do branco em cada comprimento de onda.

Para avaliação da distribuição de tamanho das nanopartículas (por espalhamento de luz dinâmico), foram utilizadas suspensões com concentração de 250 µg.mL⁻¹ de partícula em PBS diluído 10 vezes. As medidas foram feitas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern), o qual permite verificar o diâmetro hidrodinâmico médio (D.nm) e o índice de polidispersividade (PDI) da dispersão, sendo esse último utilizado para avaliar a variância da distribuição dos tamanhos de partícula em suspensão. O equipamento também foi utilizado para análise da carga superficial das nanopartículas, sob as mesmas condições de dispersão, a partir da medida de Potencial Zeta pela técnica de Espalhamento de Luz Eletroforético. Ambas as análises foram realizadas em triplicata, a 25 °C e utilizando a relação de Einstein – Smoluchowski para o cálculo do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta. A média e o desvio padrão de todas as medidas foram levados em consideração para a apresentação dos resultados.

As características morfológicas das nanopartículas foram analisadas a partir de imagens de microscopia eletrônica de alta resolução obtidas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura Quanta 450 (FEI), equipado com um canhão de emissão por campo ("field emission gun" – FEG). As amostras foram depositadas sobre substrato de silício e a análise foi realizada sob alto vácuo, pressão de 10⁻³ Pa, e feixe com tensão de aceleração de 5 kV. Além disso, o tamanho da abertura da condensadora foi de 30 µm e a distância de trabalho foi fixada em 6 mm. Por fim, para construção das imagens, foram utilizados os sinais de elétrons secundários provenientes da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra.

3.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE COLOIDAL:

O acompanhamento da sedimentação das nanopartículas ao longo do tempo foi realizado para analisar a estabilidade coloidal das suspensões de sílica na presença de diferentes polímeros, três cadeias de PEG (1,5 kDa, 12 kDa e 35 kDa), PF127 (12,5 kDa), e da proteína BSA, em PBS (10 mmol.L⁻¹). Para isso, foram preparadas suspensões com concentrações de polímero ou proteína de 0,1, 1,0, 5 e 8% m/m juntamente com 500 µg.mL⁻¹ de nanopartículas, que foram homogeneizadas em banho de ultrassom durante 3 min, com exceção daquelas contendo BSA, as quais foram misturadas apenas com pipetador automático para evitar a desnaturação proteica. Ao final, as suspensões foram então deixadas em repouso e a estabilidade das nanopartículas nas dispersões foi monitorada por registro fotográfico durante 144 h.

As condições da estabilidade coloidal das suspensões também foram caracterizadas utilizando a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). Essa técnica permite o acompanhamento da distribuição de tamanho e PDI das nanopartículas ao longo do tempo, gerando um perfil de agregação das suspensões com diferentes formulações. Além disso, utilizando-a em conjunto com a avaliação do Potencial Zeta das nanopartículas nas formulações de interesse é possível inferir sobre as interações superficiais entre partículas e os outros componentes das dispersões, no caso, polímeros e proteínas. (REZENDE *et al.*, 2003)

Sendo assim, o tamanho médio das nanopartículas e o PDI foram analisados em função do tempo utilizando suspensões com concentrações de 0,1, 1,0 e 5,0% de polímero ou BSA e 250 µg.mL⁻¹ de nanopartículas em PBS diluído dez vezes. Antes da primeira medida, todas as suspensões, exceto as contendo BSA, foram sonicadas em banho por 3 min e então foram deixadas em repouso por 70 min, durante os quais, a cada 10 min, o tamanho médio e o índice de polidispersividade das nanopartículas foram medidos no *Zetasizer Nano ZS* (Malvern).

Por outro lado, as medidas de Potencial Zeta foram realizadas com suspensões com 200 µg.mL⁻¹ de nanopartículas e concentrações de polímeros ou proteína de 40, 100, 200, 400 e 1000 µg.mL⁻¹ (gerando razões massa/massa de nanopartícula:aditivo de 1:0,2, 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:5) em PBS diluído dez vezes, com o objetivo de analisar os efeitos desses sobre a carga superficial das nanopartículas.

Todas as medidas foram realizadas a 25 °C e repetidas pelo menos três vezes utilizando-se suspensões novas. O cálculo do tamanho das nanopartículas e de seu Potencial Zeta foi derivado da relação Einstein–Smoluchowski. Além disso, para as medidas de tamanho, os valores de viscosidade e índices de refração dos meios dispersantes, PBS diluído 10 vezes com

as diferentes concentrações de polímeros, foram avaliados utilizando o Método de Ostwald e o refratômetro de Abbe, respectivamente. Os valores foram então reportados ao *software Zetasizer*, a fim de evitar erros no cálculo de tamanho de partícula devido a modificação desses parâmetros pelos aditivos na solução. Essas características físico-químicas da solução influenciam fenômenos, como o movimento Browniano das nanopartículas e a propagação da luz no meio, que são importantes para o cálculo realizado pelo *software*.

3.5 AVALIAÇÃO DA *PROTEIN CORONA*:

Para realização dos experimentos de *Protein Corona*, o PSH foi previamente centrifugado para retirada de plaquetas e excesso de lipídios. Para isso, alíquotas armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram descongeladas e centrifugadas por 10 min a 10000 rpm e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a centrifugação, o plasma limpo foi separado dos outros componentes utilizando uma pipeta automática e o procedimento foi repetido mais uma vez para posterior adição do plasma sobre as nanopartículas.

Em cada procedimento de *Protein Corona*, suspensões com $500\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de sílica e 0,1, 1,0, 5 ou 8% de polímero ou BSA foram preparadas em microtubos para um volume final de $450\text{ }\mu\text{L}$ em triplicata. As suspensões foram homogeneizadas por sonicação durante 3 min ou utilizando a pipeta automática, no caso das suspensões com BSA. Então, $550\text{ }\mu\text{L}$ de PSH foram adicionados sobre essas suspensões, resultando em uma concentração final de 55% de plasma e diluição da concentração de sílica para $225\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de estabilizantes para 0,045, 0,45, 2,25 e 3,6%.

Os tubos com nanopartículas e PSH foram incubados sem agitação por 1 h em 25°C , controlados no Termobloco (Eppendorf), e ao final, eles foram centrifugados por 1 h a 14000 rpm e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para sedimentação das nanopartículas em suspensão. Os sobrenadantes foram descartados e as SiNPs ressuspensas com $100\text{ }\mu\text{L}$ de água deionizada, para facilitar a desagregação do precipitado, e $900\text{ }\mu\text{L}$ de PBS. Esse procedimento foi repetido 3 vezes, entretanto com tempos de centrifugação de 30 min, para garantir a retirada das proteínas de plasma que não adsorveram fortemente à superfície das nanopartículas, ou seja, restando apenas as proteínas diretamente ligadas à superfície de sílica formando a HC.

Após a retirada do excesso proteico, as proteínas remanescentes foram extraídas da superfície das partículas para avaliação do perfil proteico da HC utilizando 1D SDS-PAGE. Para isso, os precipitados resultantes do processo anterior foram ressuspensos em $100\text{ }\mu\text{L}$ de água deionizada, sonicados por 2 min e então $50\text{ }\mu\text{L}$ de tampão de amostra para eletroforese (DTT 4 mmol.L^{-1} ; 150 mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH 7,0; 4,8% SDS (m/v); 24% glicerol; 0,024%

azul de bromofenol (m/v)) foram adicionados às suspensões, as quais foram sonicadas novamente por 2 min e em seguida submetidas à uma temperatura de 99 °C por 3 min em Termobloco. Por fim, os tubos foram centrifugados por 5 min a 14000 rpm e 4 °C para sedimentação das nanopartículas e 10 µL dos sobrenadantes foram inseridos em PAGE 15% para a separação das proteínas recém-extraídas.

Para cada polímero e para a BSA foram realizados três procedimentos de *Protein Corona*, nos quais cada amostra foi realizada em triplicada e no fim duas foram selecionadas para separação no gel. Após a utilização, as amostras foram armazenadas congeladas.

Os géis foram corados utilizando o corante *Coomassie Brilliant Blue R*. Para corar as bandas proteicas, os géis foram deixados imersos sob agitação em solução corante (*Coomassie R-250* 3mmol.L⁻¹, Etanol 30%, Ácido Acético 10%) por 1 hora e após esse período os géis foram lentamente descorados. Primeiramente, eles foram agitados em solução descorante (Etanol 25%, Ácido Acético 37,5%) por 30 min, então na mesma solução diluída duas vezes por mais 30 min e, por fim, eles foram deixados em água destilada por até sete dias para que o máximo do corante em excesso fosse retirado do gel sem a perda de bandas. Ao final, os géis foram escaneados e as imagens utilizadas para comparação do perfil proteico das diferentes coronas.

Além disso, amostras de um dos experimentos realizados para cada estabilizante foram novamente separadas por SDS-PAGE e os géis resultantes foram revelados utilizando o método de Nitrato de Prata, derivado de Blum *et al.* 1987, a fim de se verificar a presença ou não de bandas proteicas não detectadas pelo Coomassie e confirmar as diferenças entre as *Protein Coronas* geradas.

Por fim, também foram realizados ensaios para formação de Protein Corona utilizando suspensões de SiNPs (500 µg.mL⁻¹) com concentrações de 5 e 8% dos polímeros PEG e PF127 para o volume final do teste (1 mL), ou seja, sem causar diluição das suspensões com a adição de plasma como nos procedimentos anteriores. O objetivo desse experimento foi avaliar a acessibilidade das proteínas do plasma sanguíneo à superfície das partículas mesmo na presença de maiores concentrações de polímero no meio, assim como nas condições em que foi avaliada a estabilidade coloidal das nanopartículas. Sendo assim, as etapas do procedimento, formação da *Protein Corona*, extração das proteínas e separação por eletroforese seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente, entretanto a concentração de PSH utilizada foi de 20%, devido às maiores concentrações de polímero no meio. Ao final os géis foram revelados pelo método de Nitrato de Prata.

3.6 ALGORITMO PARA ANÁLISE DE GÉIS DE ELETROFORESE

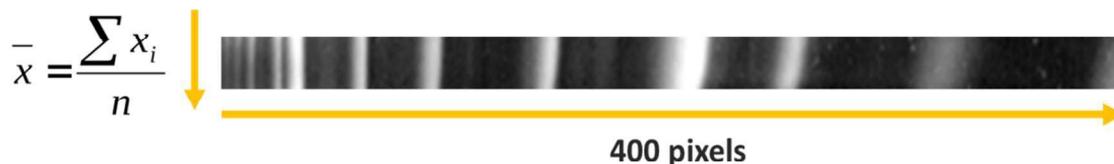
As imagens dos géis escaneados foram interpretadas utilizando um algoritmo de análise desenvolvido no *software Wolfram Mathematica*. O objetivo foi transformar o perfil proteico de cada coluna dos géis de eletroforese em um gráfico de picos com a intensidade de cada banda. A função geral do algoritmo foi avaliar os valores médios correspondentes a cor dos pixels das imagens e organizá-los em um gráfico no qual o eixo X corresponde a posição de cada pixel da imagem e o Eixo Y o valor da intensidade do pixel.

Para isso, todas as imagens foram importadas para o programa e, sequencialmente, transformadas para a escala de cinza e negativadas. Assim, os valores dos pixels variaram de 0 (preto) a 1 (branco). Nesse caso, o fundo do gel continha pixels pretos e as bandas proteicas, os brancos. Então, as colunas dos géis foram separadas e cortadas nas posições correspondentes a primeira (245 kDa) e a última (11 kDa) bandas da coluna do padrão de peso molecular de cada gel analisado e foram redimensionadas para 400 pixels de comprimento.

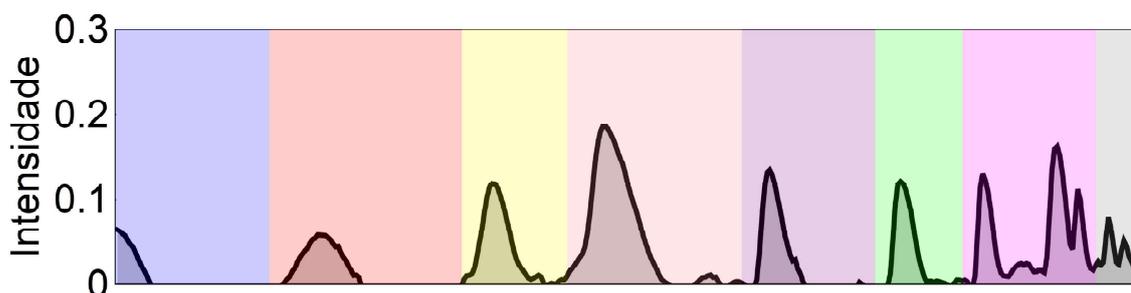
As colunas recortadas foram então rotacionadas 90° , e os valores dos pixels de cada imagem foram extraídos em forma de matrizes numéricas. Cada linha da matriz consistiu em uma linha da imagem. Então, foram realizadas as médias aritméticas de todas as matrizes, que consistem no cálculo da média dos valores de cada coluna da matriz (Figura 6a). Dessa forma, ao final, foi obtida uma lista com 400 valores de pixel, os quais resultaram no gráfico com os picos de intensidade de cada banda do gel (Figura 6b). Além disso, para identificação do peso molecular correspondente aos picos do gráfico, esse último foi dividido em 8 regiões que consistem em intervalos entre 0 e 400 relacionados às posições das bandas do padrão de peso molecular de cada gel.

Figura 6: a. Representação ilustrativa de como é calculada da média aritmética dos valores de pixels das colunas dos géis de eletroforese b. Gráfico resultante dos dados retirados.

a



b



Fonte: Autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO:

O método de síntese de Stöber é largamente utilizado para síntese de partículas de sílica monodispersas. Ele consiste na hidrólise e condensação do organossilano TEOS em solução alcoólica contendo quantidades controladas de água e amônia, e resulta em partículas esféricas, com superfície regular e carga negativa. Ele é utilizado como base para síntese de partículas de sílica com diversas características superficiais e estruturais, alterando-se poucas etapas e reagentes para isso. Desse modo essas nanopartículas são bons modelos para o estudo de coloides. A síntese de nanopartículas de sílica com fluoróforos em seu núcleo facilita os estudos de estabilidade coloidal desses materiais, pois facilita a visualização da qualidade da dispersão e permite o uso de técnicas ópticas para realização de experimentos de estabilidade coloidal, uma vez que, as nanopartículas de sílica convencionais são opticamente transparentes. (BURNS; OW; WIESNER, 2006; NYFFENEGGER; QUELLET; RICKA, 1993; OW *et al.*, 2005; VAN BLAADEREN; VRIJ, 1993)

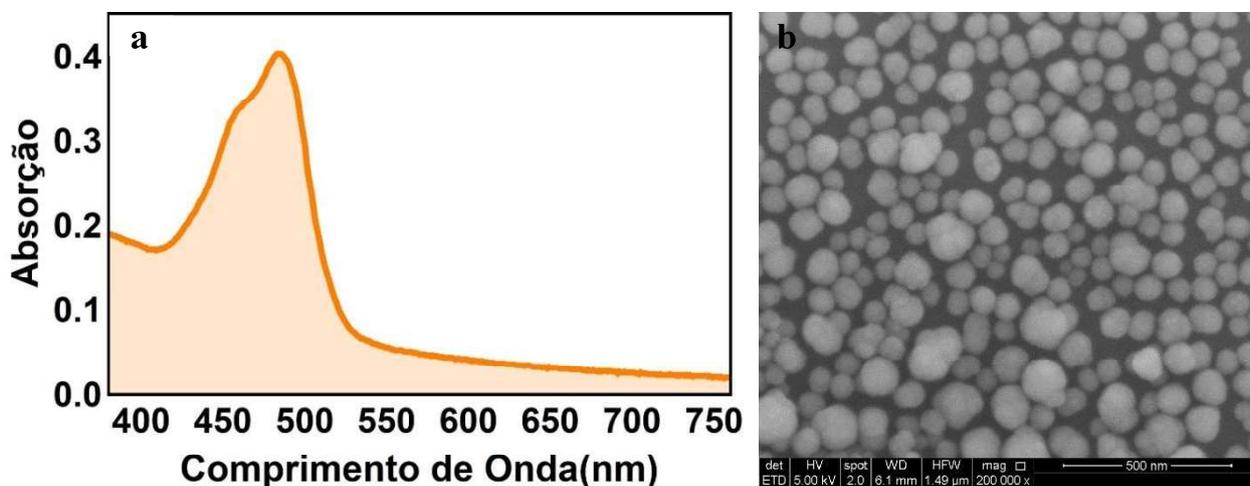
Sendo assim, para avaliar o perfil de absorção de luz das nanopartículas fluorescentes sintetizadas nesse trabalho, o espectro de absorção da suspensão foi construído para a faixa de

comprimentos de onda de 380 a 760 nm, referentes ao espectro de luz visível (Figura 7a). A suspensão de nanopartículas apresentou um pico de absorção entre, aproximadamente, 420 e 510 nm, com valor máximo em 485 nm.

A suspensão de nanopartículas utilizada para os experimentos foi caracterizada quanto tamanho, formato e carga superficial das partículas. A distribuição de tamanho e a carga das nanopartículas foram avaliadas utilizando suspensões com $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de partícula em PBS diluído 10 vezes (1 mmol.L^{-1}) por técnicas de espalhamento de luz. As nanopartículas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de $135,3 \pm 3,5 \text{ nm}$, PDI de 0,08 e carga superficial negativa, com valor de Potencial Zeta de $-56,5 \pm 9,5 \text{ mV}$, o qual é explicado pela presença de grupos silanol desprotonados na superfície das partículas.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 7b) mostraram a predominância de nanopartículas do tipo semi-esféricas, de tamanho entre 80 e 150 nm. No entanto, há presença também de nanopartículas maiores com diâmetros de até 200 nm, porém em baixa quantidade.

Figura 7: a. Espectro de absorção de luz da suspensão de SiNPs fluorescentes na faixa de comprimentos de onda do espectro visível. b) Imagem de SiNPs adquirida por Microscopia Eletrônica de Varredura



Fonte: Autor.

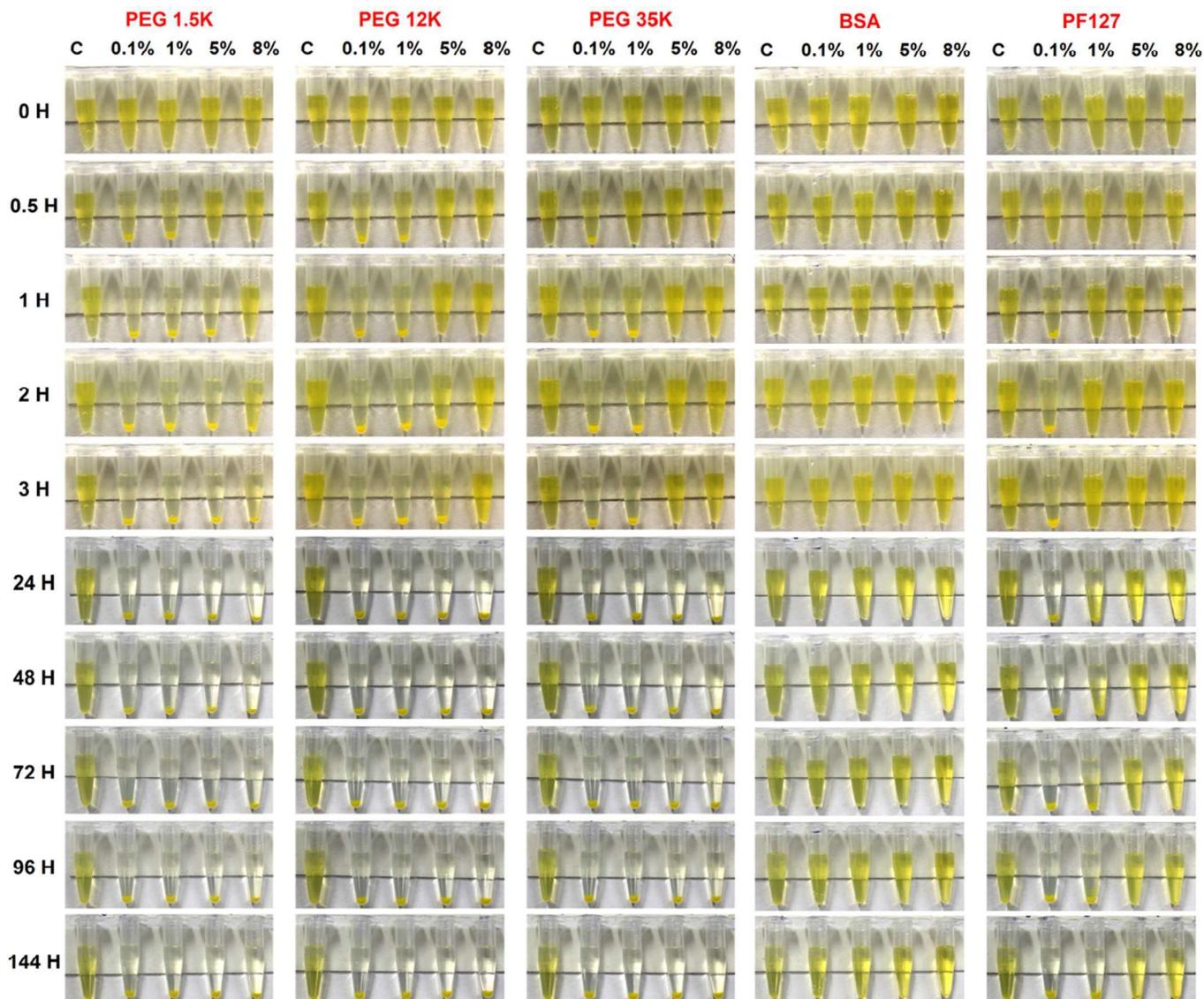
4.2 ESTABILIDADE COLOIDAL:

Os polímeros escolhidos para os estudos, PF127 e PEG, são dois compostos bastante conhecidos na literatura da área de nanobiotecnologia. O primeiro consiste em um heteropolímero sintético aprovado pela FDA, composto por duas unidades monoméricas: óxido de polipropileno (PPO; hidrofóbica), e óxido de polietileno (PEO; hidrofílica), distribuídos em uma razão aproximada de 1:2 (PPO:PEO) (ALMEIDA *et al.*, 2012). Devido à característica anfifílica da molécula, o PF127 forma micelas em solução aquosa com raio de aproximadamente 7,36 nm a partir da concentração de 2,8 μM de polímero. (KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002). Por outro lado, o PEG é um homopolímero formado apenas por unidades de PEO. Ele é quimicamente inerte e está disponível comercialmente em vários pesos moleculares de acordo com o tamanho de suas cadeias. Atualmente, ele é bastante usado para modificações covalentes de superfícies de nanopartículas com o objetivo estabilizá-las, bem como reduzir a adsorção de biomoléculas em sua superfície (PELAZ *et al.*, 2015; DAI; WALKEY; CHAN, 2014).

A BSA ($\approx 66,5$ kDa) possui estrutura bastante similar a Albumina Humana. Sua conformação globular é resultante de 17 pontes dissulfeto formadas entre resíduos de cisteína distribuídos ao longo de sua cadeia polipeptídica, a qual também contém uma grande quantidade de resíduos de aminoácidos carregados, como lisina e ácido glutâmico. Seu ponto isoelétrico é 4,8, e portanto, ela é negativamente carregada em pH fisiológico (CARTER; HO, 1994; PETERS, 1995). O uso de um modelo proteico nesse trabalho deu-se pelo conhecimento da afinidade que essas biomoléculas possuem sobre a superfície dos nanomateriais, interação que normalmente resulta em uma melhor dispersividade do material.

O acompanhamento da estabilidade coloidal das suspensões de SiNPs ao longo de 144 horas em meio com alta força iônica (PBS 10 mmol.L^{-1}) permitiu a comparação das diferentes formulações coloidais propostas nesse trabalho quanto a influência das macromoléculas utilizadas sobre a estabilidade das nanopartículas em suspensão (Figura 8). Além disso, utilizando esses dados em conjunto com os estudos de tamanho médio e potencial zeta, variando-se a concentração de estabilizantes, foi possível inferir o mecanismo de estabilização coloidal e as possíveis interações entre os polímeros e as nanopartículas de sílica.

Figura 8: Acompanhamento fotográfico da estabilidade coloidal das suspensões de SiNPs ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão fosfato ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) em conjunto com 0,0, 0,1, 1,0, 5,0 ou 8,0% m/m de polímeros ou BSA durante 144 horas.

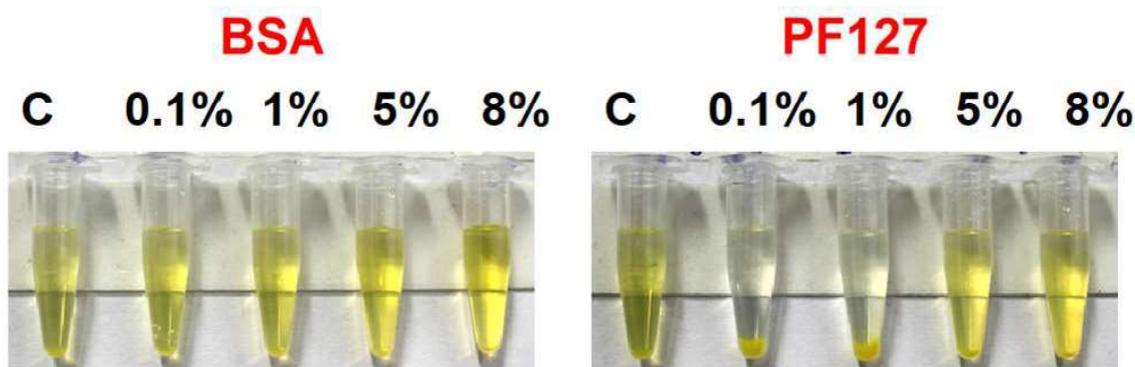


Fonte: Autor.

Comparando-se a estabilidade coloidal das suspensões de sílica com diferentes formulações: 0,0, 0,1, 1,0, 5,0 e 8,0% m/m de polímeros ou BSA em PBS, observou-se que mesmo sem moléculas estabilizantes as nanopartículas permanecem dispersas e com pouca sedimentação durante as 144 horas em PBS, o que indica a manutenção de suas cargas superficiais e a ocorrência de repulsão eletrostática entre as partículas. As suspensões contendo PEG em sua formulação apresentaram sedimentação nos primeiros trinta minutos de repouso e após 24 horas todas as suspensões sedimentaram completamente. O polímero prejudicou a estabilidade das nanopartículas em relação ao tubo controle e a extensão da instabilidade gerada foi inversamente proporcional ao peso molecular e à concentração de PEG, ou seja, a sedimentação das partículas ocorreu mais rápido em concentrações mais baixas de polímero e

nos tubos com PEG de menor peso molecular. Nas suspensões contendo PF127, as menores concentrações (0,1 e 1,0%) também causaram desestabilização do coloide, no entanto, a estabilidade coloidal aumentou juntamente com o aumento da concentração de polímero. A BSA não afetou de maneira perceptiva a dispersão das partículas e ao final das 144 horas. Nos tubos contendo 5 e 8% de PF127 e em todos os tubos com BSA a estabilidade coloidal das SiNPs foi similar (Figura 9).

Figura 9: Suspensões de SiNPs ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão fosfato ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) em conjunto com 0,0, 0,1, 1,0, 5,0 ou 8,0% m/m de BSA ou PF127 após 144 horas de repouso.

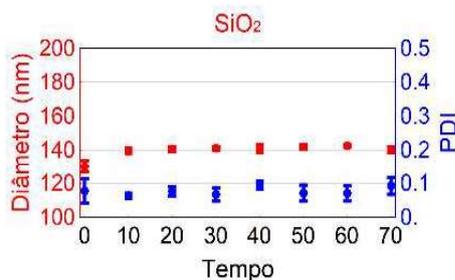


Fonte: Autor.

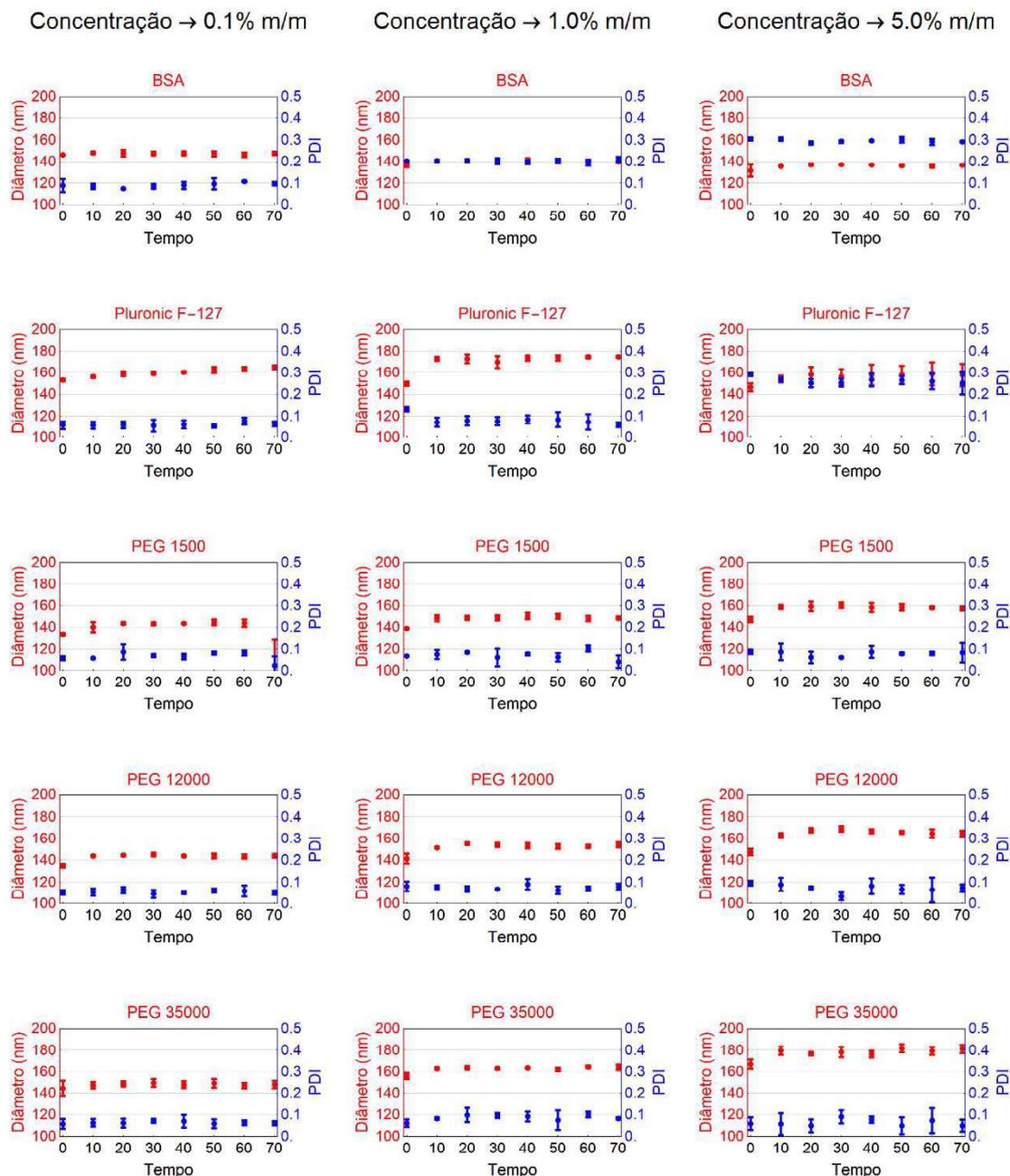
Utilizando técnicas de espalhamento de luz, foi possível construir o perfil de agregação das partículas em PBS $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, em função do tempo e da concentração de polímero ou proteína utilizado. Para isso, o tamanho médio de partícula e o PDI de suspensões de SiNPs ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) com 0,1; 1,0; 5% m/m de polímeros e BSA foram analisados por DLS ao longo de 70 minutos (Figura 10).

Figura 10: Análise do tamanho médio e do índice de polidispersividade das SiNPs ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão fosfato diluído ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) ao longo de 70 min **a.** Sem adição de estabilizantes e **b.** com adição de BSA; PF127; PEG 1,5k; PEG 12k e PEG 35k nas concentrações 0,1; 1,0 e 5% m/m.

a



b



Fonte: Autor

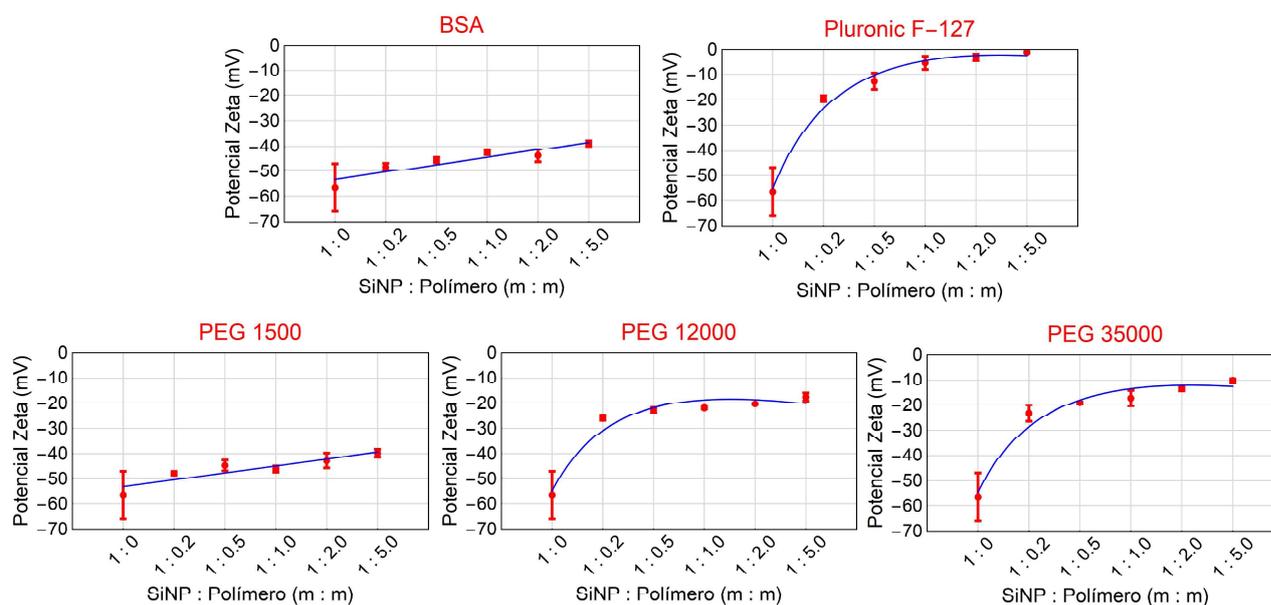
Na ausência de polímeros na suspensão, as partículas tiveram tamanho médio de 135nm e PDI de 0,08. Após 10 minutos, o diâmetro médio das partículas subiu para aproximadamente 145 nm e manteve-se constante até o fim das medidas, e o PDI também não sofreu alterações significativas ao longo do tempo (Figura 10a). Assim como na curva controle (sem aditivos), todas as curvas apresentaram um pequeno aumento no tamanho médio das partículas após 10 minutos de repouso, dessa forma, atribuiu-se que esse foi o tempo necessário para que os

sistemas coloidais entrassem em equilíbrio, ou seja, a camada iônica ao redor das partículas ficasse estável.

Nas suspensões contendo PEG (Figura 10b) o tamanho de partícula aumentou junto com a concentração de polímero, além disso, quanto maior o peso molecular do PEG mais expressivo foi esse aumento. No entanto, o PDI não sofreu alterações significativas. Por outro lado, as suspensões contendo PF127 e BSA tiveram aumento nos valores de PDI juntamente com o aumento de suas concentrações. A diferença de valores mais expressiva foi para a concentração de 5% de polímero ou proteína, e isso está relacionado tanto a possível adsorção dessas moléculas na superfície das nanopartículas, como também ao aumento da concentração de micelas em suspensão, no caso do PF127, e de moléculas de proteína nas suspensões com BSA (JACHIMSKA; WASILEWSKA; ADAMCZYK, 2008; BATRAKOVA; KABANOV, 2008;). A presença desses componentes no meio também explica a diminuição do tamanho de partícula observado com o aumento das concentrações de PF127 de 1% para 5% de polímero e de a BSA de 0,1 % para 1,0% de proteína. (ZOOK *et al.*, 2011).

As medidas de Potencial Zeta das suspensões com diferentes razões entre as concentrações de nanopartículas e estabilizantes (1:0,2, 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:5 m/m), mostraram diminuição da carga superficial das partículas com a diminuição da razão nanomaterial:estabilizante (Figura 11). Esse fenômeno foi mais expressivo para as moléculas com maior peso molecular, principalmente PF127, o qual quase neutralizou a superfície das nanopartículas. Esse resultado, em conjunto com os perfis de tamanho médio e PDI das suspensões com PF127, indicam a adsorção desse polímero na superfície da partícula. Apesar de possuir carga global negativa, a proteína BSA pode interagir com as SiNPs também negativas através de aminoácidos positivos de sua cadeia polipeptídica (TREUEL *et al.*, 2015), e por ser uma molécula carregada, a carga superficial das nanopartículas permanece bastante negativa. Por outro lado, como os PEGs e o PF127 são moléculas neutras, o Potencial Zeta do material é mais afetado com o aumento da concentração desses polímeros. Além disso, apesar de o PEG ser conhecido como uma molécula não-adsorvente, tanto os resultados de tamanho médio e Potencial Zeta mostram que há interação do polímero com a superfície das partículas.

Figura 11: Medidas de Potencial Zeta de suspensões de SiNPs ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) com Tampão Fosfato diluído ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e diferentes razões de concentração nanopartícula:estabilizante (1:0,2, 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:5 m/m).



Fonte: Autor

Diante disso, analisando-se em conjunto os efeitos que as macromoléculas testadas tiveram sobre os coloides em PBS e as interações que essas possuem com a superfície das partículas pode-se inferir sobre os principais fenômenos de estabilização e/ou desestabilização coloidal que estão ocorrendo nas dispersões produzidas. Nesse contexto, os dados de DLS e Potencial Zeta indicaram, em maior ou menor grau, adsorção de todas as macromoléculas adicionadas no meio sobre a superfície das SiNPs. Porém, para todas as dispersões contendo PEG e para as baixas concentrações de PF127 (0,1 e 1%), a presença de cadeias de polímero nas superfícies das nanopartículas não foi suficiente para estabilizar as dispersões. Esse fenômeno pode estar relacionado ao surgimento de forças de depleção atrativas devido à presença de cadeias de PEG e micelas de Pluronic livres na solução.

No caso do PF127, essa hipótese ganha força, ao observar-se que o aumento da concentração de polímero ($> 5\%$) significou a manutenção da estabilidade coloidal das suspensões de SiNPs com PF127, indicando o surgimento de forças depleativas repulsivas no sistema devido ao aumento da concentração de micelas de PF127 no meio, dessa forma, aumento a barreira energética contra desestabilização do coloide.

Para o PEG, o grau de desestabilização das dispersões diminuiu com o aumento da concentração e do tamanho da cadeia do polímero, indicando uma possível melhora da estabilidade coloidal com o aumento da concentração de polímero no meio. Na literatura, já foi reportada a capacidade do PEG de promover a ocorrência de forças de depleção, tanto atrativas

como repulsivas, em sistemas coloidais. Nesse contexto, foi verificado que a concentração e o tamanho das cadeias de PEG, e as características do sistema coloidal estudado (ex. tipo e estrutura do nanomaterial e força iônica do meio) influenciam no grau e no tipo de força depletiva evidenciada. Por exemplo, Padovani *et al.* (2015) mostraram que 5% de PEG com cadeias de 35000 kDa promoveram a estabilização de nanopartículas de óxido de grafeno em meio com 0,9% m/m de NaCl. No entanto, utilizando-se cadeias e/ou concentrações menores do polímero, a estabilidade não foi atingida. Além disso, Zhang *et al.* (2012) também evidenciaram a dependência em relação ao peso molecular e a concentração das cadeias de PEG no processo de estabilização coloidal de nanopartículas de ouro. Eles também observaram que apenas cadeias de PEG partir de 20000 kDa em concentrações acima de 2% foram capazes de manter as suspensões estáveis em meios com alta força iônica.

As suspensões contendo BSA, por outro lado, não apresentaram diferenças perceptíveis na estabilidade coloidal das nanopartículas em relação ao controle. Esse resultado era esperado, pois além de adsorver na superfície das SiNPs, a BSA possui carga líquida negativa em pH 7, fazendo com que o complexo nanopartícula – proteína seja carregado e estabilizado, em parte, por repulsões eletrostáticas e em parte por repulsão estérica.

4.3 PROTEIN CORONA

A compreensão acerca das interações entre os nanomateriais e os componentes do sistema biológicos é fundamental quando se visa a aplicação biomédica desses materiais. Nesse contexto, como normalmente o primeiro contato dos nanomateriais é com o sangue, muitos estudos de *Protein Corona* utilizam plasma sanguíneo para avaliar a formação dessa camada.

As características químicas e físicas das superfícies das nanopartículas possuem influência direta sobre a composição da *Protein Corona*. Portanto, estratégias como, funcionalização da superfície de nanopartículas com polímeros ou adição de macromoléculas estabilizantes nas dispersões, são capazes de interferir sobre os processos de adsorção proteica nas superfícies das nanopartículas.

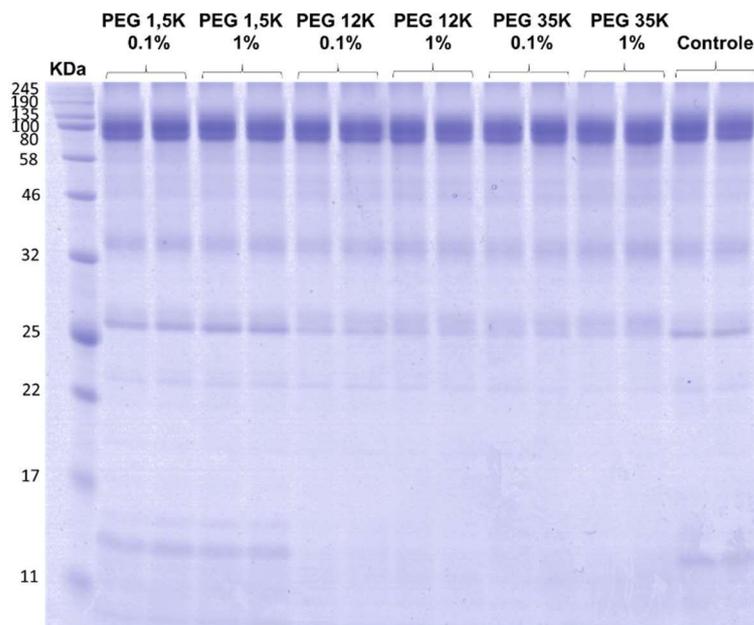
A influência do uso de polímeros covalentemente adsorvidos às nanopartículas na formação e composição da HC já é bastante estudado na literatura. Porém, pouco se sabe sobre a influência de moléculas de polímeros não-ligadas à superfície, ou seja, que permanecem livres na suspensão ou apenas adsorvidos nos nanomateriais.(DAI; WALKEY; CHAN, 2014; NATTE *et al.*, 2013; MIRSHAFIEE *et al.*, 2016). Nesse contexto, Winzen *et al.* (2016) mostraram que pequenas concentrações de surfactantes, muito utilizados para estabilizar

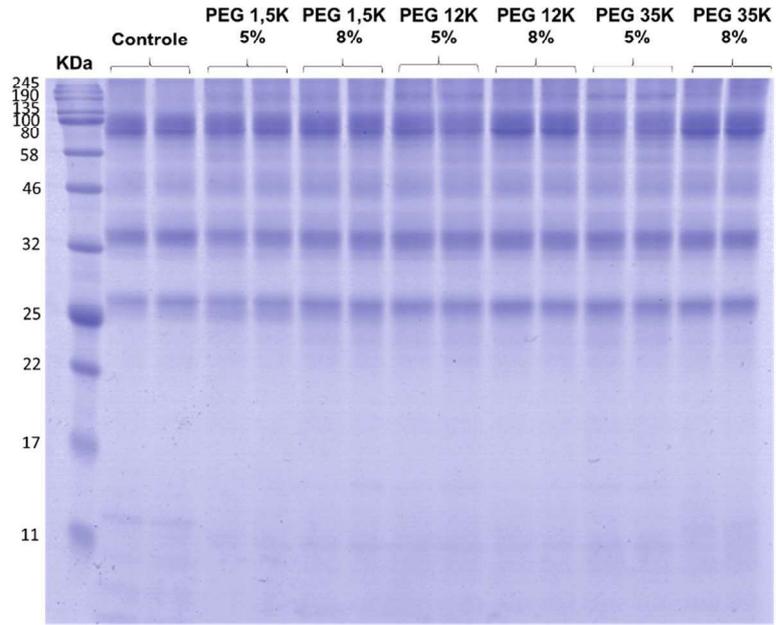
suspensões de nanopartículas, afetam a afinidade que proteínas de plasma têm sobre a superfície de nanomateriais e chama atenção para a importância de se avaliar o impacto que moléculas adicionadas como estabilizantes em suspensões de nanopartículas possuem sobre as interações da nano-bio interface.

Diante disso, avaliou-se a influência que os polímeros utilizados para os estudos de estabilidade coloidal de suspensões de SiNPs possuem sobre a formação e composição da HC na superfície das nanopartículas. O perfil da composição protéica das coronas foi analisado utilizando as imagens dos géis corados com corante *Comassie Brilliant Blue* em conjunto com o algoritmo desenvolvido no *Wolfram Mathematica* para representação das bandas proteicas do gel em gráficos de picos de intensidade (Figura 12).

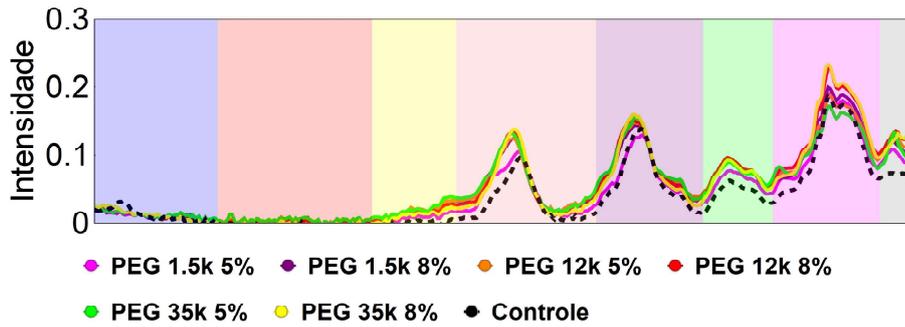
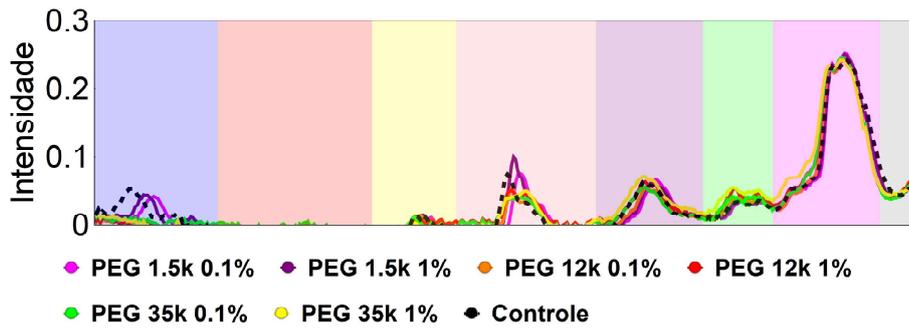
Figura 12: Análise por SDS-PAGE de proteínas da HC da superfície de SiNPs em suspensão com os polímeros **(I)** PEG, **(II)** PF127 e proteína **(III)** BSA nas concentrações de 0,0, 0,1, 1,0, 5.0 e 8.0% m/m em PBS 10mmol.L⁻¹ após incubação com plasma sanguíneo humano 55%.

I

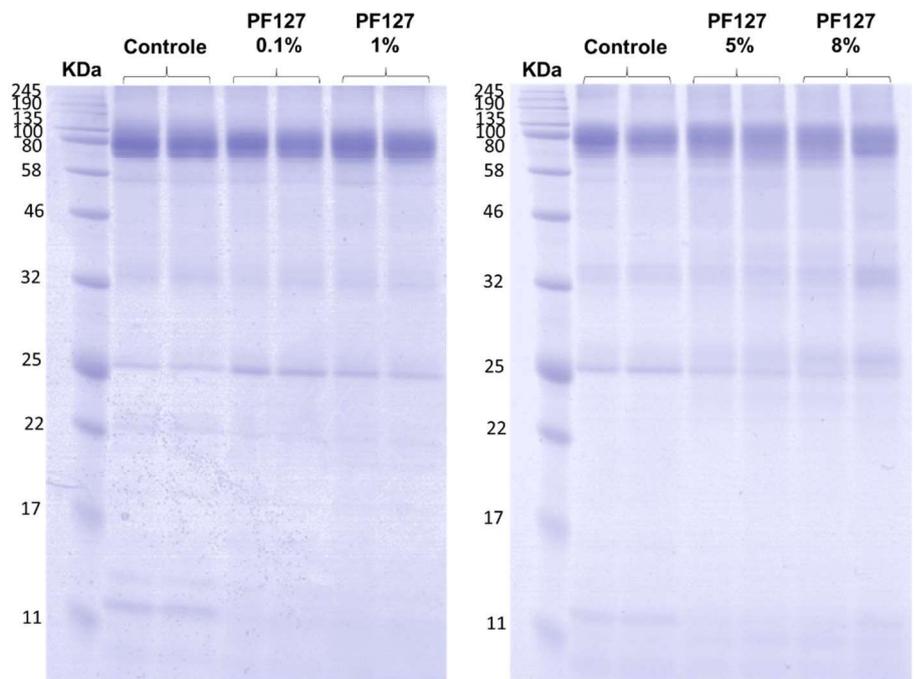




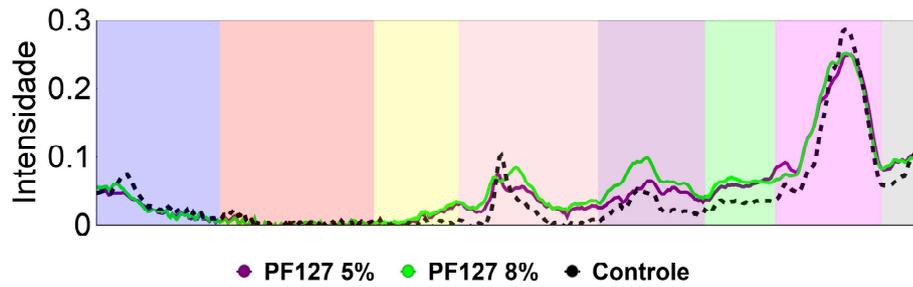
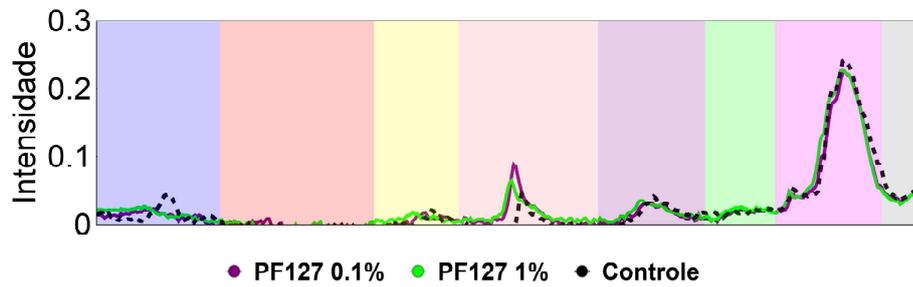
■ PM < 17kDa
 ■ 22 < PM < 25kDa
 ■ 32 < PM < 46kDa
 ■ 58 < PM < 135kDa
■ 17 < PM < 22kDa
 ■ 25 < PM < 32kDa
 ■ 46 < PM < 58kDa
 ■ PM > 135kDa



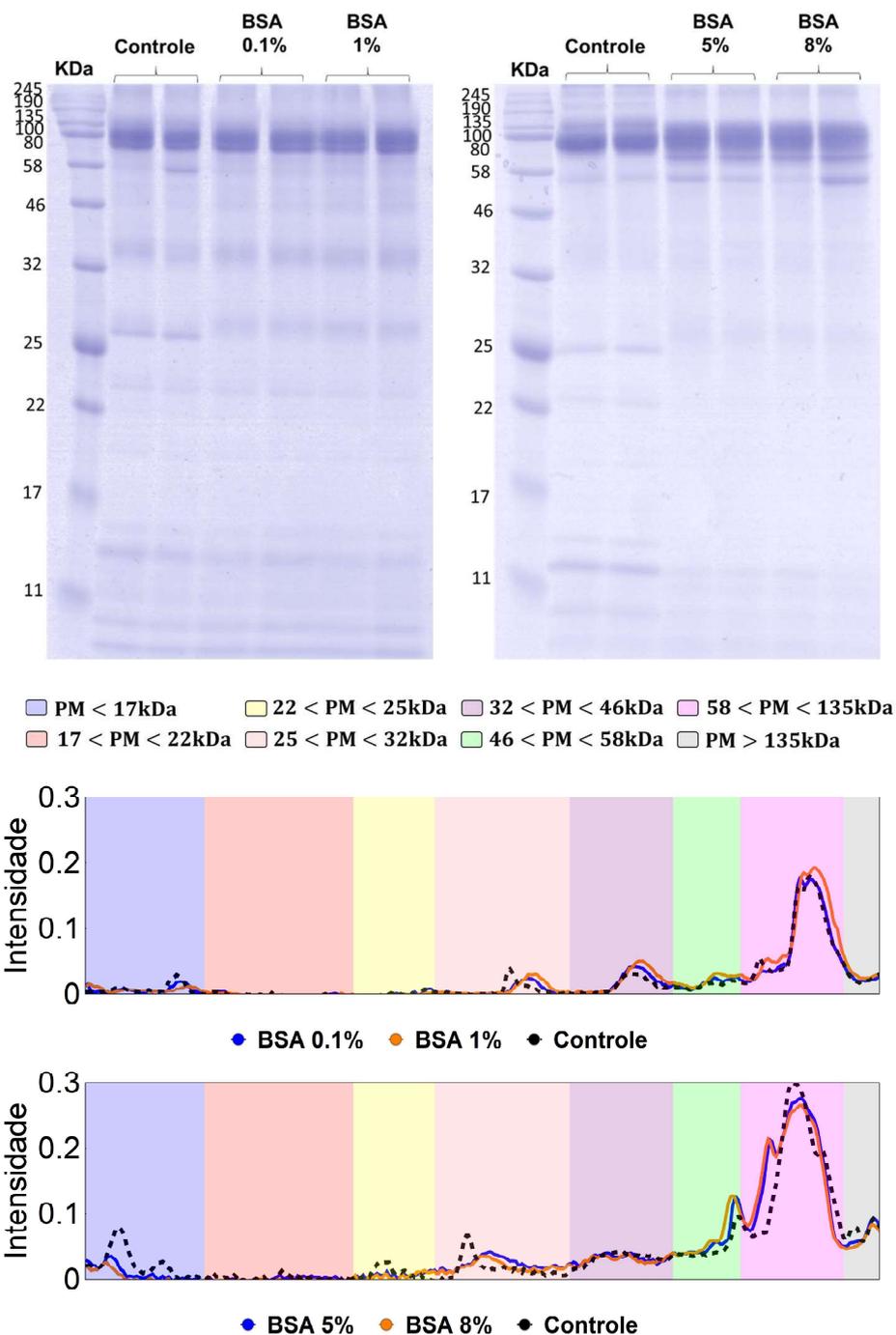
II



■ PM < 17kDa
 ■ 22 < PM < 25kDa
 ■ 32 < PM < 46kDa
 ■ 58 < PM < 135kDa
■ 17 < PM < 22kDa
 ■ 25 < PM < 32kDa
 ■ 46 < PM < 58kDa
 ■ PM > 135kDa



III



Fonte: Autor.

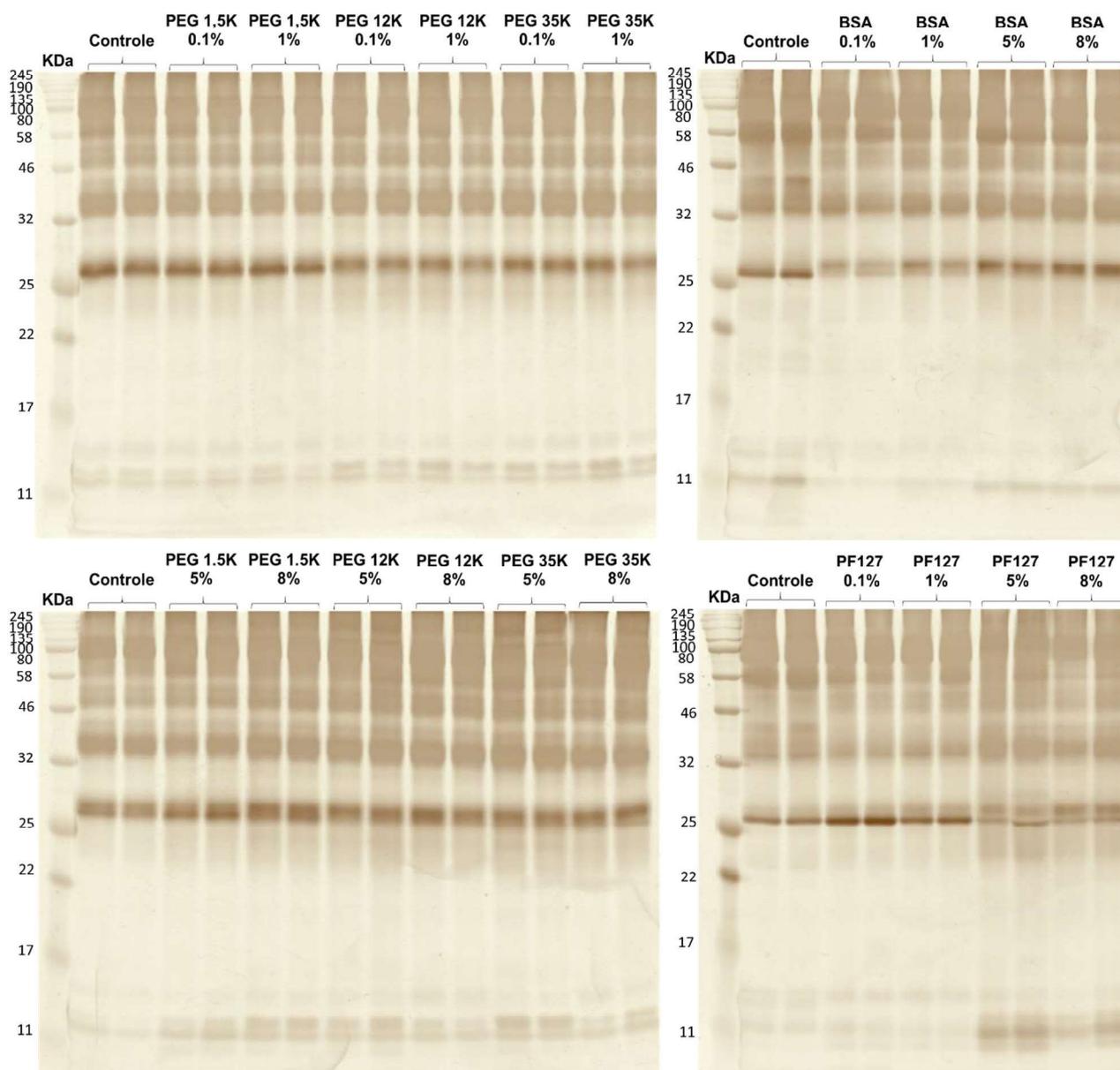
Avaliando-se o perfil proteico das coronas, de maneira geral, as proteínas acima de 25kDa foram predominantes na superfície das nanopartículas para todas as condições testadas. As amostras que continham os polímeros, PEG (1.5k, 12k e 35k) e PF127 apresentaram coronas de perfil proteico similar ao do controle, o que pode ser verificado pelo perfil das curvas dos gráficos referentes aos géis (Figura 12 I e II). Para as concentrações de 0.1 e 1% de PEG 1.5K

não houve diferenças entre as proteínas adsorvidas em relação ao controle. Entretanto, para as demais concentrações e cadeias de PEG, como também para todas as concentrações de PF127, houve uma diminuição da acessibilidade de proteínas com peso molecular abaixo de 17 kDa à superfície das partículas e as bandas que aparecem para o controle nessa faixa de tamanho, não podem ser vistas para essas condições. Por outro lado, as suspensões contendo BSA, apresentaram perfil proteico similar ao controle e as demais amostras apenas nas concentrações de 0.1 e 1%. Para as suspensões com 5 e 8% de BSA, pôde ser observada a presença de um pico dividido na faixa de tamanho de 58 a 135 kDa, de proteína, devido a presença de uma banda proteica mais intensa, ausente nas demais amostras e no controle (Figura 12 III). Além disso, para essas amostras também ocorreu uma diminuição do acesso de proteínas de baixo peso à superfície das SiNPs, assim como para as amostras contendo PEG e PF127.

No entanto, a sensibilidade de detecção proteica do método de coloração utilizando Coomassie (30–100 ng de proteína) não tem precisão para quantificar todas as proteínas na composição da *Protein Corona*. Por isso, as mesmas amostras reveladas com esse método, foram novamente separadas por eletroforese e os géis foram revelados utilizando o método com Nitrato de Prata cuja sensibilidade é de 1 ng de proteína por ponto proteico (Figura 13) (PATTON, 2002).

A partir dos géis revelados pelo novo método, pôde-se verificar a presença das bandas proteicas de baixo peso molecular, não detectadas pelo Coomassie, para as amostras com os polímeros e a BSA. Portanto, a adição dessas macromoléculas no meio não resultou no impedimento total do acesso dessas proteínas à superfície das partículas. Por outro lado, em relação as proteínas de peso molecular superior a 58 kDa, por estarem em maior quantidade, não foi possível diferenciar as bandas proteicas presentes nessa faixa de tamanho entre as amostras analisadas nesse experimento.

Figura 13: Géis de SDS-PAGE de proteínas da HC da superfície de SiNPs em suspensão com polímeros PEG, PF127 e BSA nas concentrações de 0,0, 0,1, 5,0 e 8,0% m/m em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ incubada com PSH 55%



Fonte: Autor.

A *Protein Corona* é dinâmica e a composição dela ao longo do tempo está relacionada à concentração relativa de cada molécula no meio, e principalmente ao grau de afinidade dessas pela superfície dos materiais. Sendo assim, após adição de plasma sanguíneo sobre as suspensões de SiNPs com os diferentes estabilizantes, as moléculas de polímeros ou de BSA adsorvidas na superfície das partículas ficam sujeitas a serem substituídas por proteínas que possuem maior afinidade ao material. No entanto, a presença de moléculas, proteínas ou polímeros, já adsorvidas na superfície das partículas, também podem modular o acesso de diferentes proteínas sobre os nanomateriais a partir de interações intermoleculares, por exemplo

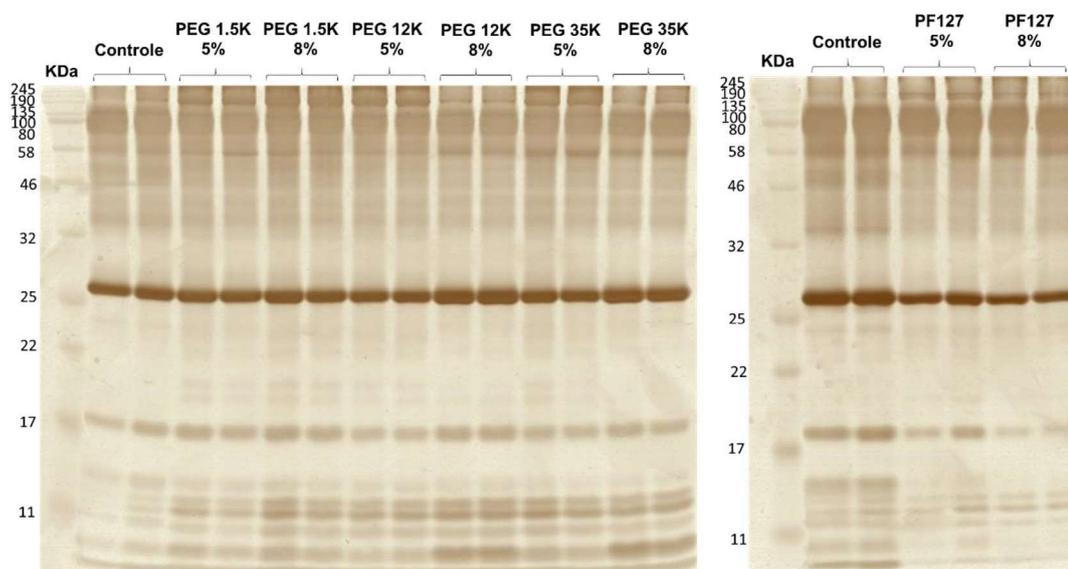
interações proteína-proteína, as quais podem favorecer ou prejudicar a adsorção de moléculas específicas sobre as nanopartículas. (MAHMOUDI *et al.*, 2016; OGAWARA *et al.*, 2004).

A BSA é capaz de adsorver na superfícies de nanopartículas de sílica e sofrer mudanças de conformação durante a adsorção (TURCI *et al.*, 2010). Sendo assim as diferenças na composição da *Protein Corona* observadas para as suspensões estabilizadas com BSA estão relacionadas com a estabilidade da adsorção dessa molécula à superfície das nanopartículas, e as possíveis interações entre ela e proteínas específicas do plasma. A presença de BSA sobre a superfície de nanopartículas pode, portanto, ter levado à adsorção de proteínas específicas presentes no plasma sobre as nanopartículas (Figura 13). No entanto, foi verificado que esse efeito também é dependente da concentração de BSA no meio, uma vez que, o perfil proteico das coronas sobre as SiNPs das suspensões com 0.1 e 1% de BSA foi similar ao perfil proteico evidenciado para o controle e para as demais amostras.

Por outro lado, os resultados mostraram que a adsorção dos polímeros PEG e PF127 sobre as SiNPs, evidenciada pelos estudos de estabilidade coloidal, é de carácter reversível e as superfícies das partículas permaneceram acessíveis às proteínas do plasma sanguíneo. A similaridade entre os perfis proteicos das HC das suspensões contendo PEG e PF127, indica que ambos interagiram com as superfícies das SiNPs por mecanismos similares. Nesse contexto, na literatura, estudos de adsorção de polímeros do tipo PEO-PPO-PEO, como o PF127, mostram que essas moléculas adsorvem na superfície de partículas de sílica pelas cadeias hidrofílicas de PEO, comuns às do PEG (SARKAR *et al.*, 2013).

Nesse contexto, uma das vantagens do mecanismo de estabilização por depleção, discutida na literatura, é que ele não requer a ligação dos polímeros às partículas para promover a estabilidade das suspensões, portanto, as superfícies dos materiais permanecem acessíveis para interação com outras moléculas do meio (KIM *et al.*, 2015; ZHANG; SERVOS; LIU, 2012). Sendo assim, para confirmar a acessibilidade das proteínas às superfícies das SiNPs nas condições de concentração de polímero em que foram feitos os testes de estabilidade, suspensões de SiNPs ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com 5 e 8% de polímeros para o volume final do teste (1mL) foram incubadas com PSH 20% e as proteínas adsorvidas foram extraídas e analisadas por SDS-PAGE (Figura 14) . Os resultados mostraram que mesmo com maiores quantidades de polímero em solução e sem o efeito da diluição causada pela adição de plasma as proteínas ainda tiveram acessibilidade às superfícies das SiNPs. Desse modo, os estudos de *Protein Corona* ajudaram a compreender as interações entre os polímeros PEG e PF127 e as SiNPs como também os mecanismos de estabilização atuantes nesses sistemas coloidais.

Figura 14: *Protein Coronas* de SiNPs incubadas com PSH 20% e polímeros nas concentrações 5 e 8% m/m para volume final de 1 mL.



Fonte: Autor.

Diante de todos os resultados apresentados, vale ressaltar que o ensaio de *Protein Corona* consiste em um teste *in vitro*. Portanto, as suspensões foram mantidas em concentração e volumes constantes, sem fluxo de moléculas, durante o período de incubação. Devido à reversibilidade da adsorção dos polímeros PEG e PF127 sobre as superfícies das nanopartículas, o uso dessas suspensões *in vivo* provavelmente (em hipótese) resultaria na separação dos polímeros do ambiente ao redor das partículas devido ao fluxo sanguíneo e a maior diluição dos componentes da suspensão. Portanto, os estudos de *Protein Corona* realizados *in vitro* foram importantes para avaliar as interações entre as moléculas estabilizantes com a superfície das nanopartículas e o efeitos que essas possuem sobre a adsorção de proteínas durante a formação da *Protein Corona*. (HADJIDEMETRIOU; KOSTARELOS, 2017)

5 CONCLUSÃO

A elucidação dos mecanismos de estabilização exercidos por macromoléculas presentes em um sistema coloidal não é simples, pois normalmente diferentes mecanismos ocorrem dentro do mesmo sistema, e distinguir a contribuição de cada um deles é de difícil análise. Entretanto, a combinação de um conjunto de metodologias para avaliar as possíveis interações entre as moléculas estabilizantes e as partículas suspensas, como também, o perfil coloidal das suspensões com diferentes formulações permitiu apontar os mecanismos de estabilização mais proeminentes nos sistemas coloidais estudados. Além disso, avaliando a influência dos estabilizantes sobre a formação da *Protein Corona* ao redor das partículas, possibilitou ainda mais a compreensão das interações entre os polímeros ou a BSA e as SiNPs.

Diante disso, foi possível verificar que os polímeros PEG e PF127 promoveram o surgimento de forças de depleção nas suspensões de SiNPs. No entanto, apenas para as concentrações de 5 e 8% de PF127 essas forças tiveram carácter repulsivo e mantiveram a dispersão das partículas, com pouca sedimentação, ao longo de 144 horas. Apesar de ocorrer adsorção dos polímeros na superfície das partículas, essas moléculas não impediram o acesso das proteínas de plasma às nanopartículas, mesmo quando em altas concentrações no meio.

A BSA adsorveu na superfície das partículas e manteve a estabilidade coloidal das suspensões por meio de mecanismos de estabilização eletroestáticos. Na superfície das partículas, essa proteína é capaz de favorecer a ligação de proteínas específicas do plasma a *Protein Corona*. No entanto esse efeito é dependente das concentrações de BSA presentes na amostra.

6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, H. et al. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 15, n. 4, p. 592–605, 2012.
- BANTZ, C. et al. The surface properties of nanoparticles determine the agglomeration state and the size of the particles under physiological conditions. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 5, n. i, p. 1774–86, 2014.
- BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 98–106, 2008.
- BERGESE, PAOLO; HAMAD-SCHIFFERLI, K. **Nanomaterial Interfaces in Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 1025
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1 jan. 1987.
- BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D. R. M.; NINHAM, B. W. Specific Ion Effects: Why DLVO Theory Fails for Biology and Colloid Systems. **Physical Review Letters**, v. 87, n. 16, p. 168103-1-168103-4, 1 out. 2001.
- BURNS, A.; OW, H.; WIESNER, U. Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards “Lab on a Particle” architectures for nanobiotechnology. **Chemical Society reviews**, v. 35, n. 11, p. 1028–42, 2006.
- CAO, G. **NANOSTRUCTURES AND NANOMATERIALS - Synthesis, Properties and Applications**. London: Imperial College Press, 2004. v. 2
- CARRILLO-CARRION, C.; CARRIL, M.; PARAK, W. J. Techniques for the experimental investigation of the protein corona. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 46, n. Figure 1, p. 106–113, ago. 2017.
- CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153–203, 1994.
- CONTADO, C. Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. August, p. 1–20, 6 ago. 2015.
- CROCKER, J. C. et al. Entropic Attraction and Repulsion in Binary Colloids Probed with a Line Optical Tweezer. **The American Physical Society**, v. 82, p. 4352–4355, 1999.
- DAI, Q.; WALKEY, C.; CHAN, W. C. W. Polyethylene glycol backfilling mitigates the

negative impact of the protein corona on nanoparticle cell targeting. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 20, p. 5093–5096, 2014.

DOCTER, D. et al. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned – challenge accepted? **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 17, p. 6094–6121, 17 ago. 2015.

DURÁN, N.; GUTERRES, S. S.; ALVES, O. L. (EDS.). **Nanotoxicology**. New York, NY: Springer New York, 2014.

EUROPEAN UNION. **COMMISSION RECOMMENDATION of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial**. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:EN:PDF>>. Acesso em: 20 out. 2017.

FOROOZANDEH, P.; AZIZ, A. A. Merging worlds of nanomaterials and biological environment: factors governing protein corona formation on nanoparticles and its biological consequences. **Nanoscale research letters**, v. 10, n. 1, p. 221, 2015.

GAZIT, E.; MITRAKI, A. **Plenty of Room for Biology at the Bottom**. 2nd. ed. London: Imperial College Press, 2013.

HADJIDEMETRIOU, M.; KOSTARELOS, K. Nanomedicine: Evolution of the nanoparticle corona. **Nature Nanotechnology**, v. 12, n. 4, p. 288–290, 6 abr. 2017.

HENK, N. W. L.; TUINIER, R. **Colloids and the Depletion Interaction**. [s.l.] Springer Heidelberg, 2011.

HUSSAIN, S. M. et al. At the crossroads of nanotoxicology in vitro: Past achievements and current challenges. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 1, p. 5–16, 2015.

JACHIMSKA, B.; WASILEWSKA, M.; ADAMCZYK, Z. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 24, n. 13, p. 6866–6872, 2008.

JEWETT, M. C.; PATOLSKY, F. Nanobiotechnology: Synthetic biology meets materials science. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 551–554, 2013.

JHA, R. K. et al. An emerging interface between life science and nanotechnology: present status and prospects of reproductive healthcare aided by nano-biotechnology. **Nano Reviews**, v. 5, n. 1, p. 22762, 2014.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 189–212, 2002.

KIM, S. et al. Depletion Stabilization in Nanoparticle–Polymer Suspensions: Multi-Length-Scale Analysis of Microstructure. **Langmuir**, v. 31, n. 6, p. 1892–1900, 17 fev. 2015.

- LANG, N. J. et al. Dissecting Colloidal Stabilization Factors in Crowded Polymer Solutions by Forming Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 29, n. 20, p. 6018–6024, 21 maio 2013.
- MAHMOUDI, M. et al. Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 679–692, 2014.
- MAHMOUDI, M. et al. Emerging understanding of the protein corona at the nano-bio interfaces. **Nano Today**, v. 11, n. 6, p. 817–832, 2016.
- MARTINEZ, D. S. T. E.; ALVES, O. L. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, v. 65, p. 32–36, 2013.
- MIRSHAFIEE, V. et al. Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake. **Biomaterials**, v. 75, p. 295–304, 2016.
- MONOPOLI, M. P. et al. Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 8, p. 2525–2534, 2011.
- MONOPOLI, M. P. et al. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 12, p. 779–786, 5 dez. 2012.
- NATTE, K. et al. Impact of polymer shell on the formation and time evolution of nanoparticle-protein corona. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 213–220, 2013.
- NYFFENEGGER, R.; QUELLET, C.; RICKA, J. Synthesis of Fluorescent, Monodispers, Colloidal Silica Particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 159, p. 150–157, 1993.
- OGAWARA, K. I. et al. Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: Implications for rational design of nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 3, p. 451–455, 2004.
- OW, H. et al. Bright and Stable Core – Shell Fluorescent Silica Nanoparticles. **Nano Letters**, v. 5, n. 1, p. 113–117, 2005.
- PADOVANI, G. C. et al. Mechanisms of Colloidal Stabilization of Oxidized Nanocarbons in the Presence of Polymers: Obtaining Highly Stable Colloids in Physiological Media. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 32, p. 18741–18752, 13 ago. 2015.
- PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 771, n. 1, p. 3–31, 2002.
- PELAZ, B. et al. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 6996–7008, 2015.
- PELAZ, B. et al. Diverse Applications of Nanomedicine. **ACS Nano**, v. 11, n. 3, p. 2313–2381,

2017.

PETERS, T. J. All About Albumin. **Academic Press, Elsevier**, p. 1–318, 1995.

PISANI, C. et al. Experimental separation steps influence the protein content of corona around mesoporous silica nanoparticles. **Nanoscale**, p. 5769–5772, 2017.

RAJ, S. et al. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 186, 2012.

REZENDE, S. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SARKAR, B. et al. Adsorption of Pluronic block copolymers on silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 422, p. 155–164, abr. 2013.

STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, n. 1, p. 62–69, 1968.

TENZER, S. et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. **Nature nanotechnology**, v. 8, n. 10, p. 772–81, 2013.

TREUEL, L. et al. Protein corona - from molecular adsorption to physiological complexity. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 857–873, 2015.

TURCI, F. et al. An integrated approach to the study of the interaction between proteins and nanoparticles. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 8336–8346, 2010.

VAN BLAADEREN, A.; VRIJ, A. Synthesis and Characterization of Monodisperse Colloidal Organo-silica Spheres. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 156, n. 1, p. 1–18, 1993.

WALKEY, C. D.; CHAN, W. C. W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2780–2799, 2012.

WINZEN, S. et al. Small Surfactant Concentration Differences Influence Adsorption of Human Serum Albumin on Polystyrene Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 11, p. 3845–3851, 14 nov. 2016.

WOLFRAM, J. et al. The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 124, n. 11, p. 17–24, 2014.

XING, X.; HUA, L.; NGAI, T. Depletion versus stabilization induced by polymers and nanoparticles: The state of the art. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 20, n. 1, p. 54–59, 2015.

ZHANG, X.; SERVOS, M. R.; LIU, J. Ultrahigh nanoparticle stability against salt, pH, and solvent with retained surface accessibility via depletion stabilization. **Journal of the American**

Chemical Society, v. 134, p. 9910–9913, 2012.

ZOOK, J. M. et al. Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 517–530, 2011.