

Preparação de nanoestruturas metálicas associadas a um peptídeo para a construção de biossensor

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

⁽¹⁾Graduanda em Licenciatura em Química – UFJF, Juiz de Fora, MG. e-mail: gabikalisto@gmail.com, ⁽²⁾Pesquisador Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽³⁾Analista Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽⁴⁾Orientador. E-mail: marcelo.bemquerer@embrapa.br

Resumo- As nanopartículas de ouro preparadas com peptídeos podem ser utilizadas como biossensores devido à estabilidade físico-química, funcionalidade ajustável e boa compatibilidade com analitos de origem biológica. O peptídeo escolhido para funcionalização das nanopartículas tem a seguinte sequência de resíduos de aminoácido: H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂, no qual o resíduo de cisteína (C) faz a ligação do peptídeo ao ouro metálico e o resíduo de histidina (H) é o sítio principal de ligação de íons Cu²⁺. Variações da razão entre as concentrações de citrato e HAuCl₃ não se mostraram eficientes para controlar o tamanho das nanoestruturas. O agente redutor foi substituído pelo boridreto de sódio e as nanopartículas de ouro obtidas foram caracterizadas em todas as fases em relação ao raio hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão em equipamento Zetasizer, por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz.

Termos para indexação: nanopartícula de ouro, peptídeo, cobre, boridreto de sódio.

Preparation of metallic nanostructures associated to a peptide for the construction of a biosensor

Abstract- Gold nanoparticles prepared with peptides can be used as biosensors due to their stable physicochemical priorities, adjustable functionality and good compatibility for biological analytes. The peptide chosen for functionalization of the nanoparticles has the following sequence of amino acid residues: H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂, in which the cysteine (C) residues anchors the peptide onto the gold surface whereas the histidine (H) residue among other moieties of the peptide chain binds to Cu²⁺ metal ions. Variations in the ratio of citrate to HAuCl₃ concentrations did not give rise to controlled particle size. Thus, sodium borohydride was substituted for citrate as the reducing agent and the obtained nanoparticles was characterized by measurements of zeta potential, hydrodynamic radius, and polydispersion index in a Zetasizer equipment, which operates by dynamic light scattering.

Index terms: Gold nanoparticle, peptide, copper, sodium borohydride.

Introdução

As nanopartículas de ouro (AuNP) possuem aplicações como sensores devido à biocompatibilidade, à facilidade de obtenção, à possibilidade de controle de tamanho, formato e carga superficial e à utilização de métodos variados de detecção, como a espectroscopia de absorvância por mudanças na posição da banda plasmônica ou os métodos eletroquímicos que são sensíveis a mudanças no potencial de óxido-redução (Chen et al., 2008; Saha et al., al., 2012). As nanopartículas de ouro podem ser funcionalizadas diretamente com peptídeo por meio da ligação de resíduos de cisteína ou pela modificação do peptídeo com a inserção de um espaçador com grupo sulfidril (Egorova et al., 2020). A ligação de peptídeos a íons metálicos apresenta aspectos de especificidade e seletividade que a torna uma estratégia valiosa em aplicações biotecnológicas, como a construção de biossensores (Lévy et al., 2004). Devido ao tamanho pequeno, as AuNPs possuem uma grande área superficial, tendendo a aglomerar-se e, conseqüentemente, a perderem as suas propriedades únicas relacionadas ao tamanho, formas e distância interparticular (Daniel; Astruc, 2004).

Assim, métodos diferentes de sínteses de nanopartículas foram desenvolvidos para controlar o tamanho e a forma e promover sua estabilização. O método de Turkevich et al. (1951) é o mais amplamente utilizado, o qual consiste em reações de óxido-redução mediadas por citrato que atua ainda como estabilizante. Este método, apesar de ser experimentalmente simples e já possuir um mecanismo de reação proposto (Ojea-Jiménez et al., 2010), continua sendo investigado e sabe-se que o tamanho e a carga das nanoestruturas dependem da razão [citrato]/[HAuCl₃] e do pH controlado pelo citrato (Ji et al., 2007). Entretanto, diversos outros redutores podem ser utilizados, alguns dos quais são extratos biológicos peculiares. Gracie et al. (2022) reduziram sais de ouro em bebidas alcoólicas envelhecidas em barris e produziram AuNPs coloridas com propriedades distintas que podem refletir a qualidade da bebida. Nanodiscos de ouro foram sintetizados por um método bioquímico em solução aquosa utilizando extrato de barata (*Periplaneta americana*) como agente redutor (Cho et al., 2023). No outro extremo, um agente redutor clássico e amplamente utilizado em química orgânica e inorgânica é o boridreto de sódio, que pode ser usado para produzir nanoestruturas de ouro em temperatura ambiente (Dearaedt et al., 2014).

Este trabalho visa à obtenção de nanopartículas de ouro com tamanhos menores e mais controlados que as nanoestruturas obtidas na presença de citrato de sódio, utilizando-se o boridreto de sódio (NaBH₄) como agente redutor para melhor estabilização após funcionalização com o peptídeo, com expectativa de desenvolvimento de um biossensor para a determinação de íon metálico em alimentos.

Material e métodos

Neste projeto, nanopartículas de ouro foram sintetizadas por via aquosa, utilizando-se o boridreto de sódio como agente redutor, e preparadas com o peptídeo por automontagem, que é um método extremamente versátil e de custo relativamente baixo se comparado a outras metodologias de sínteses envolvendo nanoestruturas metálicas, podendo ser adaptado para produções em grande escala, ressaltando as nanopartículas de ouro, vastamente aplicadas (Xiaomin et al., 2022).

A preparação das soluções coloidais de nanopartículas de ouro (AuNP), desenvolvida no Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária-LINMAP, da Embrapa Gado de Leite, foi conduzida com base em reações de óxido-redução, utilizando o boridreto de sódio (Dearaedt et al., 2014) ou o citrato de sódio (Turkevich et al., 1951) como agente redutor e estabilizante.

Inicialmente, foi feito um estudo de variação da razão molar entre citrato e HAuCl_3 . Foi preparada uma solução de estoque de citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$, MM 258,1 g/mol) a 1% (p/v), correspondente a $3,9 \times 10^{-2}$ mol/L, sendo a concentração final de $5,7 \times 10^{-4}$ mol/L. A partir desta solução estoque de citrato de sódio, retirou-se uma alíquota (de acordo com a Tabela 1), que foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de água ultrapura Milli-Q mantida em aquecimento e agitação constante até a ebulição. Após 5 minutos em ebulição, foram adicionados 50 μL da solução de ácido cloroauríco (HAuCl_3) na concentração de $2,9 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (concentração final de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L). Após alguns minutos, a solução adquiriu uma coloração avermelhada, indicando a formação das AuNPs. As soluções coloidais foram sintetizadas testando-se cinco concentrações de citrato de sódio (Tabela 1), nas quais foram realizadas quatro repetições de sínteses de nanopartículas para avaliar a razão citrato/ouro.

Após o resfriamento da solução, esta foi submetida à diálise, onde se utilizou uma membrana de celulose regenerada com diâmetro médio de 34 mm, MWCO 3,5 kDa, durante dois dias, realizando-se a troca de água por três a quatro vezes.

Tabela 1. Variações da concentração de citrato de sódio e da razão entre citrato e HAuCl_3 .

Volume	Concentração	Razão [Citrato]/[HAuCl_3]
0,2 mL	$2,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹	4
0,4 mL	$3,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹	6
0,8 mL	$6,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹	12
1,6 mL	$1,2 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹	24
3,0 mL	$2,2 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹	44

Para a síntese utilizando o boridreto de sódio como agente redutor, foi dissolvido 1,5 mg de ácido cloroauríco na concentração de $4,4 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ em 32 mL de água ultrapura Milli-Q, que foi mantida sob agitação constante por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a agitação por 15 minutos, 1,0 mL de uma solução de boridreto de sódio (1,5 mg de NaBH_4 , MM= 37,83 g/mol, $3,96 \times 10^{-2}$ mol/L) foi adicionado rapidamente sob a solução áurica, obtendo-se uma coloração avermelhada instantaneamente. A cor da solução e a ausência de aglomerados muito densos no fundo do recipiente mostraram que a partícula coloidal foi sintetizada com eficiência. O pH da solução coloidal foi variado utilizando-se uma solução de NaOH (1,0 mol/L), ajustando o pH de 4 para 10, quando foi possível observar a mudança da cor avermelhada para um azul escuro. Em seguida, foi preparado 1,0 mL de uma solução aquosa do peptídeo a $1,25 \times 10^{-3}$ mol/L (H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂, MM= 1.547,0 g/mol, 20 mg) e aplicou-se uma alíquota de 20 μL sobre a suspensão coloidal de Au, que ficou em agitação por 10 minutos. A concentração final do peptídeo foi de $8,0 \times 10^{-7}$ mol/L. A solução foi submetida à diálise, utilizando-se uma membrana com diâmetro médio de 34 mm, MWCO 3,5 kDa, durante dois dias. Para a ligação do Cu^{2+} à nanoestrutura derivatizada com o peptídeo, a membrana contendo as nanopartículas de ouro ficou submersa em uma

solução de sulfato de cobre ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L; 160mg) realizando-se a troca de água por três a quatro vezes. Este procedimento foi repetido com a substituição do CuSO_4 pelo MgSO_4 .

Resultados e discussão

Em etapas anteriores deste projeto, verificou-se que foi possível estabilizar as nanoestruturas de ouro obtidas com o citrato como agente redutor, mas havia uma variação significativa de tamanho e carga superficial das nanoestruturas obtidas na mesma condição experimental. Foi feito então um experimento de variação sistemática da razão [citrato]/[HAuCl_3] para verificar se o aumento desta razão levaria, de fato, a uma diminuição da dimensão das nanoestruturas (Ji et al., 2007). Na Tabela 2 pode ser observada uma tendência do aumento do raio hidrodinâmico das AuNPs funcionalizadas com o aumento da razão entre citrato e HAuCl_3 , mas com grande dispersão. Observamos ainda uma variação significativa dos raios hidrodinâmicos na mesma condição experimental, sugerindo que pequenas variações na temperatura próxima à ebulição podem afetar significativamente a qualidade das nanoestruturas obtidas. Como o objetivo era o de obter de forma reprodutiva tamanhos menores de nanopartículas, que são comumente melhor estabilizadas após a ligação do peptídeo, foi decidida a substituição do agente redutor por NaBH_4 .

Tabela 2 . Raios hidrodinâmicos das AuNPs

Razão molar [citrato]/[HAuCl_3] Repetições	4	6	12	24	44
1	29,90	34,12	38,51	44,11	65,23
2	40,02	27,83	40,30	36,66	64,64
3	40,44	23,88	37,23	107,1	65,25
4	63,47	41,12	35,04	135,2	157,7

Observou-se que as AuNPs reduzidas por boridreto de sódio apresentaram controle de tamanho e estabilidade maiores se comparadas com as AuNPs obtidas pelo método de óxido-redução por citrato de sódio variando-se a concentração do sal. O potencial zeta (PZ), o índice de polidispersão (PDI) e o tamanho das nanoestruturas de ouro (raio hidrodinâmico) foram obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS) a 25°C . Para as sínteses conduzidas com o boridreto de sódio como agente redutor, como mostrado na Tabela 3, ocorre um aumento progressivo do raio hidrodinâmico das AuNPs funcionalizadas com peptídeo e em solução de sulfato de cobre se comparadas com as AuNPs com NaBH_4 . Este efeito é justificado pelo acoplamento dos peptídeos e ligação de íons metálicos. As nanopartículas sintetizadas com boridreto de sódio possuem estabilidade elevada, pouca ou nenhuma agregação, apresentando o valor médio de carga superficial de $-36,4$ mV. O valor de PZ diminuiu devido à interação com o peptídeo que possui cargas positivas no grupo amina na cadeia lateral de lisina (K) e no grupamento histidina (H). Porém, o valor do potencial zeta torna-se novamente mais negativo após a adição da solução de CuSO_4 , provavelmente pela presença de íons SO_4^{2-} . Os índices de polidispersividade são considerados aceitáveis, mostrando uma uniformidade na distribuição dos tamanhos, com valores de PDI de 0,2 a 0,4 (Casanova, 2010). As AuNPs em solução de CuSO_4 agregaram durante a diálise. Os íons Cu^{2+} e SO_4^{2-} formam uma ponte entre duas partículas e criam uma força atrativa intermolecular, agregando-as. Esse fato explica o valor de PDI ser maior se comparado com as outras sínteses (Chen et al., 2008). Na presença de MgSO_4 , as nanoestruturas de ouro derivatizadas com o peptídeo também apresentaram carga

superficial mais negativa que antes da adição do sal inorgânico, evidenciando, novamente, que os íons SO_4^{2-} parecem ter um efeito pronunciado na nanoestrutura (Tabela 3). Apesar da carga negativa das nanoestruturas ter sido menor que -25 mV na presença de CuSO_4 e MgSO_4 , o que indicaria a estabilidade coloidal (Lu; Kessler, 2006), estas partículas apresentaram agregação pronunciada durante a diálise. Portanto, para que o biossensor possa ser aplicado para a detecção de cobre é necessário conduzir estudos com outros sais como o CuCl_2 e o CuBr_2 .

Tabela 3. Índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e raio hidrodinâmico das nanopartículas de ouro. Um valor representativo de medição é mostrado juntamente com o seu PDI.

Nanopartículas	PDI	Potencial Zeta (mV)	Raio Hidrodinâmico
AuNP com NaBH_4	0,271	-36,4	55,0
AuNP com peptídeo	0,238	-14,1	159,8
AuNP em Cu^{2+}	0,351	-39,7	230,5
AuNP em Mg^{2+}	0,417	-21,4	161,9

Conclusões

Concluiu-se que foi possível a síntese das nanoestruturas de ouro preparadas com peptídeos por meio de técnicas simples, controlando o tamanho e forma. Entretanto, ainda é necessária a utilização de outras abordagens com os fatores que favoreçam de forma efetiva a detecção do íon Cu^{2+} , requerendo estabilidade coloidal e resistência a interações iônicas.

Agradecimentos

Ao pesquisador Marcelo Bemquerer pela orientação na iniciação científica. À Embrapa pela elevada qualidade do treinamento. Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

- ANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- CHO, J. L.; LIU, S.; WANG, P. Green chemical synthesis of size-controlled gold nanodisk governed by hydrophilic protein/peptide-rich aqueous extract from american cockroach, *Periplaneta americana*. **BioNanoScience**, v. 13, p. 167-175, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12668-022-01049-y>.
- CHEN, H.; KOU, X.; YANG, Z.; NI, W.; WANG, J. Shape and size dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, n. 10, p. 5233-5237, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/la800305j>.
- DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293-346, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr030698+>.
- EGOROVA, E. A.; VAN RIJT, M. M. J.; SOMMERDIJK, N.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A.; BOYLE, A. L.; KROS, A. One peptide for them all: gold nanoparticles of different sizes are stabilized by a common peptide amphiphile. **ACS Nano**, v. 14, n. 5, p. 5874-5886, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c01021>.
- DEARAEDT, C.; SALMON, L.; GATARD, S.; CIGANDA, R.; HERNANDEZ, R.; RUIZ, J.; ASTRUC, D. Sodium borohydride stabilizes very active gold nanoparticle catalysts. **Chemical Communications**, v. 50, n. 91, p. 14194-14196, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4cc05946h>.

GRACIE, J.; ZAMBERLAN, F.; ANDREWS, I. B.; SMITH, B. O.; PEVELER, W. J. Growth of plasmonic nanoparticles for aging cask-matured whisky. **ACS Applied Nano Materials**, v. 5, n. 10, p. 15362-15368, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c03406>.

JI, X.; SONG, X.; LI, J.; BAI, Y.; YANG, W.; PENG, X. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 45, p. 13939-13948, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja074447k>.

LÉVY, R.; THANH, N. T. K.; DOTY, R. C.; HUSSAIN, I.; NICHOLS, R. J.; SCHIFFRIN, D. J.; BRUST, M.; FERNIG, D. G. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 32, p. 10076-10084, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0487269>.

LU, K.; KESSLER, C. Colloidal dispersion and rheology study of nanoparticles. **Journal of Materials Science**, v. 41, n. 17, p. 5613-5618, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10853-006-0303-5>.

OJEA-JIMÉNEZ, I.; ROMERO, F. M.; BASTÚS, N. G.; PUNTES, V. Small gold nanoparticles synthesized with sodium citrate and heavy water: Insights into the reaction mechanism. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 4, p. 1800-1804, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp9091305>.

SAHA, K.; AGASTI, S. S.; KIM, C.; LI, X.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 27393-2779, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr2001178>.

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

XIAOMIN, X.; YANG, L.; YUJIE, Y.; JINGJING, W.; MEIWEN, C.; LI, S. One-pot synthesis of functional peptide-modified gold nanoparticles for gene delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 640, article 128491, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128491>.