

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS-UNIFAL-MG

CÍNTIA DAS DORES AGUIAR

ESTUDOS INTERACIONAIS ENTRE DIFERENTES
NANOPARTÍCULAS COM ESTRUTURAS
SUPRAMOLECULARES DE INTERESSE BIOLÓGICO

ALFENAS/MG
2022

CÍNTIA DAS DORES AGUIAR

ESTUDOS INTERACIONAIS ENTRE DIFERENTES
NANOPARTÍCULAS COM ESTRUTURAS
SUPRAMOLECULARES DE INTERESSE BIOLÓGICO

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor (a) em
Química pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Físico-Química.
Orientador: Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso.
Coorientador: Prof. Dr. José Maurício S. da
Silva.

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Aguiar, Cínthia das Dores.

Estudos interacionais entre diferentes nanopartículas com estruturas supramoleculares de interesse biológico / Cínthia das Dores Aguiar. - Alfenas, MG, 2022.

142 f. : il. -

Orientador(a): Luciano Sindra Virtuoso.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. CdTe. 2. AuNPs. 3. Bicamada lipídica. 4. Proteínas. 5. Estudos interacionais. I. Virtuoso, Luciano Sindra, orient. II. Título.

Estudos Interacionais Entre Diferentes Nanopartículas com Estruturas Supramoleculares de Interesse Biológico

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Aprovada em: 31 de janeiro de 2022

Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Ellen Raphael
Instituição: Universidade do Estado do Amazonas

Prof. Dr. Elivelton Alves Ferreira
Instituição: Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Gabriel Max Dias Ferreira
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Marcus Vinícius Cangussu Cardoso
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Sindra Virtuoso, Professor do Magistério Superior**, em 01/02/2022, às 08:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ellen Raphael, Usuário Externo**, em 02/02/2022, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Max Dias Ferreira, Usuário Externo**, em 02/02/2022, às 10:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcus Vinícius Cangussu Cardoso, Usuário Externo**, em 02/02/2022, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elivelton Alves Ferreira, Usuário Externo**, em 02/02/2022, às 19:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0668428** e o código CRC **4E5DF580**.

“Esta tese é dedicada aos meus pais, Ana Lúcia de Fátima Montijo e Antônio Carlos de Aguiar, pilares da minha formação como ser humano.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso, pelos ensinamentos na área da Química, pelo profissionalismo e caráter humano. Agradecer em especial pela confiança por todo conhecimento compartilhado ao longo da execução deste trabalho e de trabalhos anteriores. Da mesma forma agradeço os conhecimentos na área e vivência com meu coorientador, Prof. Dr. José Maurício S. da Silva.

Também gostaria de agradecer a todo suporte técnico fornecido por diversos professores e laboratórios que permitiram a realização deste trabalho, dentro e fora de nossa universidade. Aos laboratórios: Laboratório de Pesquisa em Bioquímica, Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal – LFQM, Laboratório Interdisciplinar de Química – LabIQ, Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos – LACFar, Laboratório de Sistemas de Liberação de Fármacos – LSLF, dentre outros situados na UNIFAL-MG.

Agradeço em especial a contribuição do Prof. Dr. Luis Henrique Mendes da Silva e do Grupo de Pesquisa Química Verde Coloidal e Macromolecular Quivecom, situado na Universidade Federal de Viçosa-UFV.

Agradeço de forma especial aos colegas do Grupo de Pesquisa Química de Coloides, pelo apoio e companheirismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim e nem menos importante, gostaria de agradecer a todos os funcionários da UNIFAL-MG e das demais universidades por todo o trabalho que realizam, que em sua ausência seria impossível a realização do trabalho.

"Nós, cientistas, acreditamos que o que nós e nossos semelhantes fizermos ou deixarmos de fazer nos próximos anos determinará o destino de nossa civilização. E consideramos nossa tarefa explicar incansavelmente essa verdade, ajudar as pessoas a perceber tudo o que está em jogo e trabalhar, não para contemporizar, mas para aumentar o entendimento e conseguir, finalmente, a harmonia entre os povos e nações de diferentes pontos de vista."

Albert Einstein, 1954.

RESUMO

Nas últimas décadas uma enorme gama de pesquisas surgiu explorando o uso de nanopartículas (NPs) metálicas como sistemas transportadores de drogas e pontos quânticos (PQs) como biomarcadores específicos. Entretanto, os mecanismos de interação destes nanomateriais com o meio biológico ainda são pouco compreendidos e constituem um desafio para o desenvolvimento de uma série de aplicações envolvendo o uso seguro. Nesse sentido, o objetivo central norteador do trabalho foi entender como diferentes NPs afetam e são afetadas por estruturas supramoleculares de interesse biológico. Dessa forma, a contribuir com respostas para essa desafiadora questão, a síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) e telureto de cádmio (CdTe) foram conduzidas na primeira etapa e caracterizadas. Na segunda etapa, iniciamos a investigação de um método para avaliação da interação entre NPs metálicas (AuNPs 4, 15, 40 e 60 nm) com Membrana de Bicamada Lipídica Suportada (s-BLM), um eletrodo de platina, com uso da técnica de voltametria cíclica (VC). A s-BLM se formou sobre o eletrodo de platina e se mostrou estável. Além disso pode-se verificar que AuNPs de diferentes tamanhos induzem diferentes respostas na integridade da s-BLM de acordo com o tempo de exposição a dispersões de AuNPs. Para explorar a aplicação in vivo de pontos quânticos (PQs), utilizamos a técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) para investigar a cinética e a termodinâmica das interações entre a albumina sérica humana (HSA) e PQs de CdTe, funcionalizados com ácido mercaptopropiônico (MPA) ou ácido tioglicólico (TGA). A análise cinética mostrou que as interações HSA-PQ envolveram a formação de complexos de transição. Apesar das semelhanças estruturais entre MPA e TGA, a formação de $[HSA - CdTe@TGA]^{\ddagger}$ por associação de HSA livre e PQs exigiu 70% mais energia e maior ganho entrópico do que para formação de $[HSA - CdTe@MPA]^{\ddagger}$. Enquanto a dissociação exigiu maior energia e menor perda de entropia do que para dissociação de $[HSA - CdTe@TGA]^{\ddagger}$. A estabilidade dos $[HSA - PQs]^{\ddagger}$ foi independente da temperatura e do grupo funcionalizador. Contudo, os componentes entálpicos e entrópicos foram altamente afetados por PQs de CdTe@MPA. Portanto, diferenças na funcionalização do PQ e densidades de cobertura superficial podem alterar a interação HSA-PQ e, portanto, sua aplicação.

Palavras-chave: AuNPs; CdTe; bicamada lipídica; proteínas; estudos interacionais; cinética.

ABSTRACT

In the last few decades, a huge amount of research has emerged exploring the use of metallic nanoparticles (NPs) as drug delivery systems and quantum dots (QDs) as specific biomarkers. However, the mechanisms of interaction of these nanomaterials with the biological environment are still poorly understood and constitute a challenge for the development of a series of applications involving safe use. In this sense, the central objective of the work was to understand how different NPs affect and are affected by supramolecular structures of biological interest. Thus, to contribute with answers to this challenging question, the synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and cadmium telluride (CdTe) were conducted in the first step and characterized. In the second stage, we started the investigation of a method to evaluate the interaction between metallic NPs (AuNPs 4, 15, 40 and 60 nm) with Supported Lipid Bilayer Membrane (s-BLM), a platinum electrode, using the technique of cyclic voltammetry (CV). The s-BLM formed on the platinum electrode and was stable. Furthermore, it can be verified that AuNPs of different sizes induce different responses in the integrity of s-BLM according to the time of exposure to AuNP dispersions. To explore the *in vivo* application of quantum dots (QDs), we used the surface plasmon resonance (SPR) technique to investigate the kinetics and thermodynamics of interactions between human serum albumin (HSA) and CdTe QDs, functionalized with mercaptopropionic acid (MPA) or thioglycolic acid (TGA). Kinetic analysis showed that HSA-QD interactions involved the formation of transition complexes. Despite the structural similarities between MPA and TGA, the formation of $[\text{HSA} - \text{CdTe@TGA}]^\ddagger$ by association of free HSA and QDs required 70% more energy and greater entropic gain than for the formation of $[\text{HSA} - \text{CdTe@MPA}]^\ddagger$. While dissociation required higher energy and lower entropy loss than dissociation $[\text{HSA} - \text{CdTe@TGA}]^\ddagger$. The stability of $[\text{HSA} - \text{QDs}]^\circ$ was independent of temperature and functionalizing group. However, enthalpic and entropic components were highly affected by CdTe@MPA QDs. Therefore, differences in QD functionalization and surface coverage densities can alter the HSA-QD interaction and, therefore, its application.

Keywords: AuNPs; CdTe; lipid bilayer; proteins; interactional studies; kinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação dos níveis de energia eletrônico ao se ligar átomos.....	24
Figura 2 -	Ligantes de superfície para CdTe em meio aquoso.....	27
Figura 3 -	Modelos de membrana.....	30
Figura 4 -	Representação esquemática de um aminoácido.....	31
Figura 5 -	Representação dos níveis estruturais das proteínas.....	32
Figura 6 -	Representação esquemática para técnica de Voltametria cíclica.	49
Figura 7 -	Configuração de Kretschmann para SPR.....	52
Figura 8 -	Representação esquemática do perfil de adsorção de proteína por SPR.....	54
Figura 9 -	Representação esquemática da superfície do filme de prata/ouro modificada com diferentes superfícies sensoras.....	55
Figura 10 -	Esquema de síntese de AuNPs pelo método de crescimento de sementes.....	66
Figura 11 -	Esquema de síntese de PQs de CdTe em meio aquoso.....	68
Figura 12 -	Método de preparação da s-BLM.....	70
Figura 13 -	Espectro eletrônico de absorção da solução de nanopartículas de ouro de 4, 15, 40 e 60 nm.....	76
Figura 14 -	Espectros de absorção no UV-vis dos pontos quânticos obtidos na síntese.....	77
Figura 15 -	Espectros de fotoluminescência dos pontos quânticos obtidos na síntese.....	78
Figura 16 -	Análise por DLS e potencial zeta para os pontos quânticos.....	81
Figura 17 -	Imagem de TEM obtida para nanopartículas de CdTe@TGA.....	82
Figura 18 -	Difratogramas de raios x de PQs de CdTe.....	83
Figura 19 -	Espectros de FTIR de para os ligantes de TGA e MPA e dos PQs.....	84
Figura 20 -	Voltamograma cíclico da transferência de carga de íons de ferrocianeto na superfície do eletrodo.....	86

Figura 21 -	Gráfico de formação da s-BLM em função do pico de corrente anódica.....	87
Figura 22 -	Dados eletroquímicos para a ação de ferrocianeto na estrutura da s-BLM formada no tempo de 2 min.....	88
Figura 23 -	Voltamogramas cíclicos para rompimento da s-BLM após contato com solução de SDS 1% variando-se o tempo de varredura.....	90
Figura 24 -	Análise do processo interacional entre AuNPs de 4 nm com a s-BLM.....	93
Figura 25 -	Gráfico da corrente de pico anódica (I_{pa}) versus tempo de contato da s-BLM com as AuNPs de diferentes tamanhos.....	94
Figura 26 -	Análise do processo interacional entre AuNPs de 15 nm com a s-BLM.....	95
Figura 27 -	Análise do processo interacional entre AuNPs de 40 nm com a s-BLM.....	96
Figura 28 -	Análise do processo interacional entre AuNPs de 60 nm com a s-BLM.....	98
Figura 29 -	Voltamogramas cíclicos da interação AuNPs de 15 nm (concentração reduzida à 50%) com a s-BLM.....	99
Figura 30 -	Curvas representativas de dose-resposta sigmoidal de AuNPs de diferentes tamanhos com a célula Calu-3.....	101
Figura 31 -	Sensogramas (UR vs. Tempo/s) para interação da proteína com os pontos quânticos.....	103
Figura 32 -	Gráficos de Arrhenius de $\ln k_a$ (■) e $\ln k_d$ (○), associados às interações HSA– CdTe@MPA e HSA–CdTe@TGA como funções da temperatura.....	106
Figura 33 -	Figura 1 - Análise de docking molecular da interação HSA-MPA e HSA-TGA.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diâmetros médios e potencial de superfície das AuNPs obtidos por DLS e Potencial Zeta.....	77
Tabela 2 -	Principais dados obtidos a partir dos espectros de absorção e emissão.....	79
Tabela 3 -	Análise de tamanho de partícula e potencial zeta ($P\zeta$) para os PQs.....	82
Tabela 4 -	Principais atribuições de bandas observadas no infravermelho para PQs de CdTe@TGA e CdTe@MPA.....	84
Tabela 5 -	Constantes de velocidade para a associação (k_a) e dissociação (k_d) de HSA-CdTe@MPA e HSA-CdTe@TGA.....	105
Tabela 6 -	Parâmetros energéticos para a formação do complexo de transição de HSA – PQs.....	108
Tabela 7 -	Valores de K_D , ΔG° , ΔH° e $T\Delta S^\circ$ para os complexos termodinamicamente estáveis de HSA–CdTe@MPA e HSA–CdTe@TGA.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADSV	Voltametria adsortiva de redissolução
ALA	Aminoácido Alanina
Au	Ouro
AgNPs	Nanopartículas de Prata
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
CALB	Enzima lipase de candida
Calu-3	Linhagem pulmonar humana
CL	Colesterol
CA	Cisteamina
CYS	Cisteína
DLS	Dynamic Light Scattering (Espalhamento Dinâmico de Luz)
DMSO	Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de dimetilo
DPA	D-penicilamina
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
FBS	Soro fetal bovino
GLN	Aminoácido Glutamina
GSH	Glutathione
HSA	Human Serum Albumin (Albumina sérica humana)
IR	Espectroscopia de infravermelho
k_a	Constante cinética de associação
k_d	Constante cinética de dissociação
K_D	Constante de dissociação de equilíbrio
k_{obs}	Constante observada
LEU	Aminoácido Leucina
LSs	Ligantes de superfície
MAA	Ácido mercaptoacético
MAS	Ácido mercaptosuccínico
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MPA	Ácido 3-mercaptopropiônico
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio

MUA	Ácido mercaptoundecanóico
NHS	N-hidroxissuccinimida
NCs	Nanocristais
NPs	Nanopartículas
PC	L- α -Fosfatidilcolina
PDI	Índice de polidispersidade
Pζ	Potencial Zeta
Pt	Platina
PZ	Potencial Zeta
PL	Photoluminescence (Fotoluminescência)
PMMA	Polimetilmetacrilato
PG	Fosfatidilglicerol
PQs	Pontos quânticos
PC	Fosfatilcolinas
QCM-D	Quartz crystal microbalance with dissipation (Microbalança de quartzo com dissipação)
s-BLM	Bilayer Lipid Membranes (Membranas de Bicamada Lipídica Suportada)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)
SER	Aminoácido Serina
SPR	Surface Plasmon Resonance (Ressonância Plasmônica de Superfície)
TGA	Ácido tioglicólico
TST	Teoria do estado de transição
UR	Unidade de ressonância
UV-vis	Espectroscopia Ultra Violeta-visível
VAL	Aminoácido Valina
VC	Voltametria Cíclica
E_x^\ddagger	Energia de ativação
E_a^\ddagger	Energia de ativação da associação de moléculas livres
E_d^\ddagger	Energia de ativação da dissociação de moléculas livres
c	Velocidade da luz
h	Constante de Planck
ΔG°	Mudança de energia livre de Gibbs padrão
ΔH°	Varição de entalpia padrão

$T\Delta S^\circ$	Varição de entropia padrão
ΔG^\ddagger	Mudança de energia livre de Gibbs
ΔH^\ddagger	Mudança de entalpia
$T\Delta S^\ddagger$	Mudança de entropia
λ	Comprimento de onda da luz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	NANOMATERIAIS.....	20
2.1.1	Nanopartículas metálicas de ouro.....	20
2.1.2	Pontos quânticos de CdTe.....	23
2.2	ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES DE INTERESSE BIOLÓGICO.....	28
2.2.1	Bicamadas lipídicas.....	28
2.2.2	Proteínas.....	31
2.3	TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ESTUDOS INTERACIONAIS.....	34
2.3.1	Técnicas de caracterização de nanopartículas.....	34
2.3.1.1	Espectroscopia na região do UV-Visível (UV-Vis).....	34
2.3.1.2	Espectroscopia de fotoluminescência (PL).....	36
2.3.1.3	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (Pζ).....	37
2.3.1.4	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	40
2.3.1.5	Difração de raios x (DRX).....	42
2.3.1.6	Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FITR).....	44
2.3.2	Técnicas e métodos eletroquímicos.....	45
2.3.2.1	Voltametria Cíclica.....	48
2.3.3	Técnica de ressonância plasmônica de superfície.....	51
2.4	ESTUDOS INTERACIONAIS ENTRE NANOPARTÍCULAS COM ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES BIOLÓGICAS.....	57
2.4.1	Interação de AuNPs com bicamada lipídica.....	57
2.4.2	Interação de PQs de CdTe com proteínas.....	60
3	OBJETIVOS.....	63
3.1	OBJETIVO GERAL.....	63
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	64

4.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	64
4.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PONTOS QUÂNTICOS DE CdTe.....	65
4.2.1	Síntese de nanopartículas de ouro.....	65
4.2.2	Métodos de caracterização das nanopartículas de ouro.....	66
4.2.3	Síntese dos nanocristais de CdTe.....	67
4.2.4	Métodos de caracterização dos pontos quânticos de CdTe..	68
4.3	PREPARO DE BICAMADAS LIPÍDICAS SUPOSTADAS (s-BLM).....	69
4.4	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	71
4.5	ANÁLISE POR RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE.....	72
4.6	ANÁLISE POR DOCKING MOLECULAR DA INTERAÇÃO DO LIGANTE MPA E TGA COM A HSA.....	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	74
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS.....	74
5.1.1	Caracterização das AuNPs.....	74
5.1.2	Síntese e caracterização de pontos quânticos de CdTe.....	77
5.2	ESTUDO INTERACIONAL ENTRE OS NANOMATERIAIS COM AS ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES.....	85
5.2.1	Estudo interacional de AuNPs com membrana suportada..	85
5.2.1.1	Caracterização da s-BLM na superfície do eletrodo por voltametria cíclica.....	86
5.2.1.2	Estudo do efeito do tamanho de AuNPs na interação com a membrana suportada por voltametria cíclica.....	90
5.2.1.3	Estudo da citotoxicidade de AuNPs.....	100
5.2.2	Estudo da interação HSA-PQs por SPR.....	101
5.2.2.1	Estudo cinética das interações entre HSA-PQs.....	101
5.2.2.2	Parâmetros energéticos relacionados à formação do complexo ativado por HSA-PQs.....	106
5.2.2.3	Caracterização termodinâmica das interações HSA-PQ.....	113
5.2.2.4	Docking molecular de interação de HSA com os ligantes MPA e TGA.....	115

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
	REFERÊNCIAS.....	119
	APÊNDICE.....	137

1 INTRODUÇÃO

Muitas inovações têm sido apresentadas quanto à utilização de nanopartículas (NPs) como dispositivo de transporte de materiais, devido as suas características de biocompatibilidade com organismos vivos (CHAKRABORTY *et al.*, 2018). Contudo, sabe-se que nanomateriais em geral, podem ser altamente reativos e desestabilizar a homeostase dos sistemas biológicos, por conta do seu tamanho, forma, carga, composição e cobertura estabilizante (DE OLIVEIRA, J. F. A. *et al.*, 2017; MOSQUERA *et al.*, 2018). Assim, todos os processos inovadores envolvendo NPs precisam ainda ser bem compreendidos em termos de um fundamento: os mecanismos envolvidos na interação das NPs com estruturas supramoleculares biológicas, como membranas e proteínas, por exemplo. Entretanto, o estudo dessas interações é um paradigma pouco explorado e entendido, por isso, atualmente há enorme interesse da comunidade científica no entendimento desses mecanismos de interação, tanto à nível de aplicação médica dos nanomateriais, bem como para tratar racionalmente alguns aspectos chaves da nanotoxicologia (SILVA, L. P. *et al.*, 2017).

Pelo extenso número de novas aplicações das NPs, estudos sobre as interações NPs-membrana e/ou NPs-proteínas têm sido conduzidos na tentativa de desvendar a toxicidade das NPs para os organismos vivos, e por isso tem atualmente impulsionado diversas pesquisas em áreas como as da bioquímica, biomedicina e nanomedicina. Entre as várias estruturas supramoleculares de interesse biológico, as membranas celulares e as proteínas se destacam pela grande ocorrência e importantes atividades nos diversos tipos de tecidos dos organismos vivos (CANEPA *et al.*, 2021). Em geral, membranas celulares exibem carga negativa de superfície e contêm uma camada rica em proteínas, ancorada à bicamada lipídica (MOREIRA, 2014). Estas estruturas dinâmicas podem sofrer mudanças químicas e físicas dependendo do ambiente no qual as células são expostas. Devido a inerente complexidade das membranas celulares, modelos celulares de membranas compostas de bicamadas lipídicas, naturais ou sintéticas, têm sido tipicamente usados para estudar a estrutura e organização das mesmas (BONDAR, 2019). Os modelos celulares oferecem vantagens, pois eliminam os efeitos do crescimento e do metabolismo celular (BONDAR, 2019).

Nas membranas biológicas, as proteínas exercem papel fundamental na estrutura e função, sua atividade está diretamente relacionada a processos de endocitose e fagocitose (MOREIRA, 2014). Estudos tem mostrado que as proteínas são capazes de formar poros/canais na membrana favorecendo a entrada e tráfego de substâncias (GRUPI *et al.*, 2019; KIRSCH; BÖCKMANN, 2016). Diversas pesquisas têm sido realizadas estudando a interação dos pontos

quânticos (PQs) com membranas, como possíveis marcadores biológicos (HAN *et al.*, 2019; NIENHAUS; WANG; NIENHAUS, 2020; PELAZ *et al.*, 2017). Para isso, tais materiais devem internalizar as células para marcarem organelas específicas. Entretanto, as proteínas presentes podem reconhecer tais materiais como corpos estranhos e expulsá-los. Por outro lado, pode ocorrer a formação de complexos estáveis de Proteínas-PQs, carreando ao local específico ou podem formar complexos instáveis que podem danificar a estrutura proteica (CEDERVALL *et al.*, 2007). Portanto, a elucidação das interações específicas envolvidas na interface nano-bio (membrana) é necessária para o uso eficiente e seguro de nanomateriais, afim de minimizar efeitos adversos (CHEN, R. *et al.*, 2018). Dessa forma, um estudo aprofundado sobre os fenômenos que ocorrem na interface nano-bio (membrana) pode permitir, não apenas o desenvolvimento de novas metodologias, mas também contribuir para a expansão de possíveis aplicações biotecnológicas e ambientais desses materiais (DE BARROS *et al.*, 2019).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as interações de diferentes nanomateriais, como AuNPs de diferentes tamanhos (4, 15, 40 e 60 nm), PQs de CdTe estabilizados com diferentes ligantes de superfície (ácido mercaptopropiônico (MPA) ou ácido tioglicólico (TGA)), com estruturas supramoleculares de interesse: membrana artificial suportada em eletrodo de platina (s-BLM) e a proteína do plasma albumina sérica humana (HSA), a partir da técnica de voltametria cíclica (VC) e ressonância plasmônica de superfície (SPR), respectivamente. O estudo das interações presentes nesses diferentes sistemas pode ajudar a compreender os mecanismos envolvidos na interação de nanomateriais com células, e as possíveis modificações estruturais, além de processos de eliminação e entre outros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica a ser descrita está separada em seções para melhor compreensão dos assuntos abordados, a princípio será abordado questões relacionadas aos nanomateriais, e em seguida aspectos relacionados aos sistemas supramoleculares de interesse.

2.1 NANOMATERIAIS

Os nanomateriais tem impulsionado pesquisas em vários campos do conhecimento, por isso têm ganhado destaque na comunidade científica por sua propensão para resolver vários desafios no ramo da medicina e biotecnologia (NIENHAUS; WANG; NIENHAUS, 2020). Seu uso tem se tornado vantajoso, devido às propriedades únicas, como alta área de superfície, alta reatividade e propriedades mecânicas. Características que são altamente interessantes para resolver questões como imageamento celular e carreamento de fármacos (PHOGAT; KOHL; UDDIN, 2018). Assim, nesta seção, revisamos o que são esses nanomateriais e algumas aplicações de nanomateriais metálicos de ouro e pontos quânticos de CdTe.

2.1.1 Nanopartículas metálicas de ouro

Material em nano escala, são aqueles que possuem pelo menos uma de suas dimensões na ordem de 1 a 100 nm. Nesse sentido, nanopartículas (NPs) são materiais extremamente pequenos, pois todas as suas dimensões estão nessa faixa de tamanho, gerando uma enorme área superficial e propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas muito distintas daquelas de partículas e de superfícies macroscópicas (ANTONIO AGUILAR-TAPIA; ZANELLA, 2017). O aproveitamento destas propriedades é a base dos estudos em nanotecnologia e vem ganhando merecido destaque atualmente. Os nanomateriais apresentam grande potencial para melhorar a qualidade de vida do homem. No entanto, como ainda são muito recentes os estudos nesta área, o uso desses materiais pode levar riscos ao meio ambiente e à saúde humana, devido a sua bioacumulação nos organismos vivos (AHMAD *et al.*, 2021; LEE, K. X. *et al.*, 2020; SILVA, L. P. *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2014).

Em particular, as propriedades eletrônicas, ópticas, catalíticas e magnéticas de nanopartículas de ouro tornam-as extremamente interessante para uma variedade de aplicações biomédicas (BANSAL *et al.*, 2020; ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; OLIVEIRA, J. P. *et al.*, 2020). Essas propriedades distintas das NPs metálicas advêm das suas características

intrínsecas como uma grande área superficial e diferentes funcionalizações em sua superfície (HU, S. *et al.*, 2019). Suas propriedades ópticas surgem devido ao fato de exibirem uma forte ressonância de plasmom de superfície localizada (do inglês, LSPR - *localized surface plasmon resonance*), que têm sido exploradas em novas técnicas de imagiologia (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2012; HUANG *et al.*, 2006; JEON; TSALU; HA, 2019), biosensoriamento (CANEPA *et al.*, 2021) e em terapias fototérmicas no infravermelho próximo (XIONG *et al.*, 2014). Estudos tem relatado que NPs de cobre (CuNPs), por exemplo, podem ser aplicadas na medicina devido ao fato deste metal apresentar propriedades antimicrobianas, estas pequenas partículas em contato com células doentes exibem atividade germicida que ajuda prevenir infecções (RAMAZANZADEH *et al.*, 2015). Nanopartículas de prata também têm apresentado elevada ação antibacteriana e têm sido exploradas em diversas inovações médicas e tecnológicas. Contudo, impactos ambientais relacionados ao uso de AgNPs também têm sido apontados (DE OLIVEIRA, J. F. A. *et al.*, 2017). Por outro lado, nanopartículas de ouro (AuNPs) não apresentam toxicidade tão elevadas como a de prata e por isso, tem sido largamente estudada em novas ações terapêuticas e métodos de diagnósticos (NALAWADE; MUKHERJEE; KAPOOR, 2012).

As AuNPs apresentam algumas características particulares, decorrente dos grupos funcionalizantes que contém em sua superfície, tal como condutividade e propriedades colorimétricas (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2012). Tais características tem potencializado seu emprego, como marcadores, para a detecção de moléculas biológicas (HU, X. *et al.*, 2020). Ademais, a utilização de sequências de alguns oligonucleotídeos, precursores de vários microrganismos, dentre eles, bactérias, vírus e outros agentes patogênicos, na formação de conjugados com as AuNPs, tem comprovado sua alta eficiência na identificação e no diagnóstico de várias doenças, assim como no reconhecimento e detecção sequencial de fragmentos de DNA (ALAFEEF *et al.*, 2021; ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; HU, X. *et al.*, 2020; SHEVTSOV *et al.*, 2018). Além disso, a exploração das propriedades ópticas e eletrônicas destes materiais tem permitido a construção de biossensores, seu uso em sistema de liberação gradativa de drogas, lubrificantes, células solares, catálise, entre outros (FAN; CHENG; SUN, 2020; IELO *et al.*, 2021; SARFRAZ; KHAN, 2021). As AuNPs, com ligantes de superfície específicos, apresentam a propriedade de ligar-se a macromoléculas em particular e esta característica pode ser explorada em muitos processos de encapsulação de materiais de interesses clínico (HU, X. *et al.*, 2020). Enea e colaboradores (2021), estudaram a captação celular e a toxicidade de AuNPs em dois modelos de células hepáticas e verificaram que os nanomateriais podem apresentar baixa citotoxicidade e alta internalização. Foi verificado a

importância do uso adequado da NP para testar a biocompatibilidade hepática, uma vez que a partir delas, os autores observaram que a captação foi altamente dependente do tempo, além da forma, tamanho e do ligante de superfície da nanopartícula em contato com o modelo de célula. Observaram que AuNPs de 15 nm, com citrato como agente estabilizante, apresentaram a maior captação celular, entretanto menor biocompatibilidade com células hepáticas em meio suplementado com FBS (soro fetal bovino). Enquanto que, nanoesferas com o ligante de ácido mercaptoundecanóico (MUA) de 15 nm, apresentaram toxicidade relativamente alta para o mesmo tipo de célula. Observaram que nanoesferas menores de 15 nm devem ser evitadas devido a um possível efeito prejudicial no fígado (ENE A *et al.*, 2021). A forma de nanostars (nanoestrelas) de AuNPs, demonstraram melhores propriedades ópticas do que AuNPs na forma esférica, sendo melhores para uso em sistemas de identificação, além de demonstrar boa biocompatibilidade e internalização em células hepáticas (ENE A *et al.*, 2021). Todos esses estudos são importantes e mostram que as AuNPs, dependendo das características de superfície, possuem alto potencial para aplicação em diagnósticos ou para atuar como carreadores de drogas para tratamento em órgão específicos (CRAWFORD *et al.*, 2017; ESPINOSA *et al.*, 2016).

Outro estudo reporta AuNPs funcionalizadas com anticorpos, com possível potencial para melhorar a tecnologia de biossensores devido suas propriedades ópticas e a especificidade das interações anticorpo-antígeno (TRIPATHI; DRISKELL, 2018). Barros e colaboradores, usaram AuNPs revestidos com a enzima lipase de *Candida* (CALB), amplamente estudada por ser um catalisador eficiente, tanto para hidrólise em meio aquoso, quanto para esterificação em meio aquo-restrito ou solventes orgânicos puros. Foi demonstrado, que a CALB pode ser utilizada como agente estabilizador para AuNPs, mantendo sua atividade catalítica. Por outro lado, AuNPs também desempenham um papel na estabilização da CALB em meio aquoso. Assim, materiais bio-híbridos (compostos de AuNPs e CALB) foram obtidos e apresentaram bio-funcionalidades. Materiais bio-híbridos possibilitam o desenvolvimento de estratégias mais seguras de aplicação de AuNPs em meios biológicos contendo enzimas, uma vez que a elucidação das interações que ocorrem na interface nano-bio fornece a base para o desenvolvimento de novos materiais com desempenho biológico desejado (DE BARROS *et al.*, 2019). Além disso, estudos têm demonstrado a difusão rápida de AuNPs através de membranas, devido ao seu tamanho e química de superfície. Nanopartículas estabilizadas com citrato tem sido utilizadas para múltiplas aplicações biomédicas, incluindo uso de carreadores de fármacos, condutores térmicos para ablação de tumores, além de agentes intensificadores de imagem (HE *et al.*, 2015). As interações da luz com a nanoestrutura têm sido usadas para aproveitar a energia

do fóton para erradicar células cancerígenas usando ressonância plasmônica de superfície (HU, S. *et al.*, 2019; QIAN; ZHU; JIN, 2012).

Entretanto, uma série de questões ainda estão sem repostas, pois para uso de AuNPs para transportar pequenas moléculas ou produtos biológicos para um local específico, é necessário estudos sobre processos interacionais mais específicos. As AuNPs podem ter inúmeras características decorrente de fatores influenciados pelos seus ligantes de superfície. Sendo assim, se torna importante descobrir quais critérios e princípios de design são críticos para obter um material específico para uma entrega local no organismo (YU, X. *et al.*, 2016). O sucesso e as limitações dos nanomateriais testados até o momento, revelaram três tarefas essenciais que as nanopartículas (NPs) devem realizar para entrega específica de medicamentos. Em primeiro lugar, as NPs devem ter um tempo de circulação adequado que lhes permitam atingir o órgão de ação de interesse. Em segundo, devem ser capazes de agir apenas sobre este órgão, não atingindo locais saudáveis. Por fim, as NPs devem ser compostas por um material biodegradável, que permita a eliminação do corpo sem efeitos nocivos (SUSHNITHA *et al.*, 2020). Dessa forma, ainda não é possível inferir sobre a real citotoxicidade destes materiais à longo prazo e quais os mecanismos de interações físico-químicos com membranas. Sabe-se atualmente que o tamanho e a forma das AuNPs afetam significativamente suas propriedades intrínsecas e por isso, grandes esforços têm sido tomados para a síntese controlada de AuNPs nos últimos anos (CONTINI *et al.*, 2020).

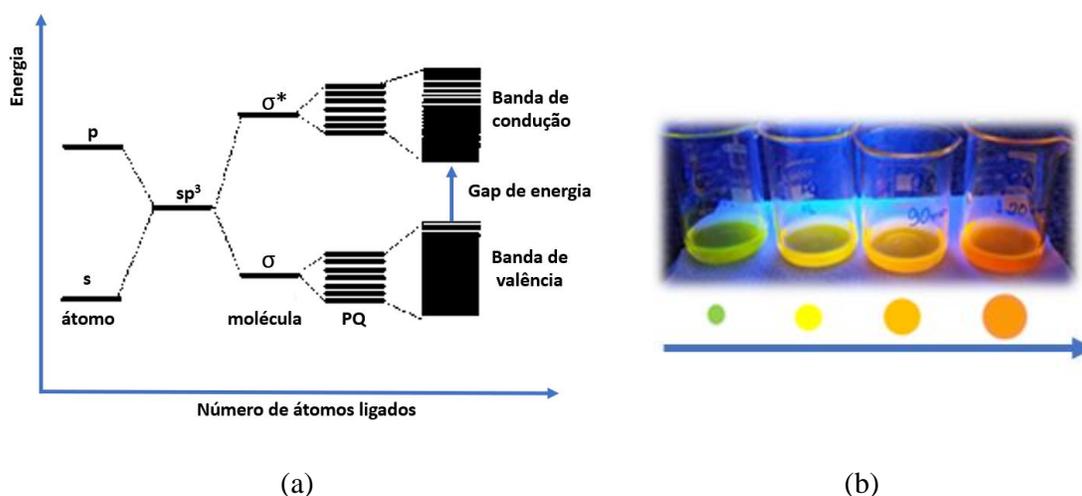
2.1.2 Pontos quânticos de CdTe

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, surgiu uma importante classe de nanomateriais semicondutores denominados pontos quânticos (PQs) ou do inglês *quantum dots* (QDs). Estes materiais são cristais coloidais semicondutores, constituídos de algumas centenas de átomos em uma estrutura cristalina de forma geralmente esférica e de dimensões em nanômetros. Se caracterizam por exibirem propriedades muito distintas do cristal macroscópico de origem, como: tamanho, distribuição, morfologia, fase, composição, propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas, químicas, entre outras (KUMAR, 2021; MEZRAG; BOUARISSA, 2019).

Diferentemente dos materiais cristalinos e metálicos, em que há bandas contínuas de energia (superposição de bandas), nos pontos quânticos a energia é discreta e quantizada (VALE; VIEIRA; SOUSA; FERRARI, 2015). Isso porque, apresentam um tamanho entre 1 a 10 nm (M. KADIM, 2020; SOUSA *et al.*, 2014), ocorrendo o fenômeno conhecido como

confinamento quântico. Dessa forma, seus elétrons permanecem “presos” em três dimensões, dos quais as três são encontradas em escala nanométrica. Em consequência disso, há alterações também no *band gap*, ou seja, na energia necessária para promover um elétron da banda de valência para a banda de condução, tais características geram efeitos ópticos diretamente dependentes do tamanho (SANDRI *et al.*, 2017). Como pode ser observado na Figura 1, em que há a representação dos níveis de energia eletrônico ao se ligar átomos, os níveis discretos de energia dos orbitais atômicos se fundem em faixas de energia, aqui mostradas para um material semiconductor (VALE *et al.*, 2019).

Figura 1 - Representação dos níveis de energia eletrônico ao se ligar átomos.



Fonte: Adaptação (MARONESI *et al.*, 2016).

Legenda: (a) Níveis de energia eletrônico dependente do número de átomos ligados, (b) Relação fluorescência com o tamanho e cor de pontos quânticos de CdTe@MPA.

Como relatado na Figura 1 (a), é possível visualizar como a quantidade de átomos e a diferença de energia, da banda de valência para a banda condução, modifica de acordo com o tamanho do material. O *band gap* de um ponto quântico pode ser calculado através da equação da energia de um fóton, descrito na equação 1.

$$E_g = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

Na qual, E_g refere-se a energia do *band gap*, h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J s), c a velocidade da luz no vácuo ($2,998 \times 10^8$ m/s) e λ refere-se ao comprimento de onda da luz

onde ocorre absorção máxima. Nos pontos quânticos, a energia do *band gap* varia de acordo com o tamanho do material, isso significa que o comprimento de onda de máxima absorção irá variar conferindo à essas nanopartículas propriedades ópticas distintas, como ilustra a Figura 1 (b). A variação de tamanho dos nanocristais provocam o deslocamento dos estados de energia, ou seja, alteração do comprimento de onda para níveis mais altos. Essa diferença no aumento do comprimento de onda é observada tanto para absorção, quanto para emissão (ROGACH *et al.*, 2007; VALE *et al.*, 2019).

Além disso, é possível estimar o tamanho dos pontos quânticos de CdTe por meio do comprimento de onda dos máximos de absorção obtidos experimentalmente. PENG e colaboradores, observaram que a posição de máximo no espectro é fortemente dependente do tamanho da partícula, estabelecendo dessa maneira, uma função de ajuste empírico, equação 2 (YU, W. W. *et al.*, 2003):

$$D = (9,8127 \times 10^{-7}) \cdot \lambda_{abs}^3 - (1,7147 \times 10^{-3}) \cdot \lambda_{abs}^2 + (1.0064) \cdot \lambda_{abs} - (194,84) \quad (2)$$

Estudos realizados após a estipulação da equação 2, estimam que os tamanhos obtidos pela mesma são em até 25% compatíveis às análises feitas por microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de transmissão (HAASE; WELLER; HENGLEIN, 1988).

Relatos do uso de pontos quânticos ocorreram recentemente na história, com o uso de vidro silicato, coloração vermelha, com sulfeto de cádmio (CdS) e seleneto de cádmio (CdSe), no entanto apenas em 1932, utilizando análises de raios-X, foi descoberto que o que confere esta coloração a estes materiais são os PQs (DA ROSA *et al.*, 2021; EKIMOV; EFROS; ONUSHCHENKO, 1985). Entretanto, apenas na década de 80 foi relatada a primeira síntese de PQs em meio orgânico (ROGACH *et al.*, 2007). Todavia, métodos de síntese orgânicos são altamente perigosos, manipulados em altas temperaturas, de difícil solubilização em meio aquoso e geram gases tóxicos (BONILLA; KOUZNETSOV, 2016). Em meados de 1996, foi desenvolvida a primeira síntese em meio aquoso (MARONESI *et al.*, 2016). Suas únicas desvantagens com relação a síntese orgânica são a baixa eficiência quântica e a geração de materiais mais polidispersos (MARONESI *et al.*, 2016). Desde então, diversas rotas em meio aquoso têm sido propostas com o objetivo de aperfeiçoar e simplificar os métodos já existentes, e assim, tornar possível a obtenção de nanocristais com uma distribuição estreita de tamanhos, alta cristalinidade e baixos defeitos de superfície.

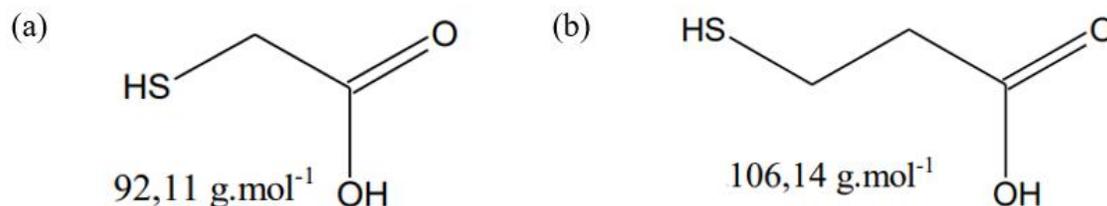
A partir disso, é possível realizar sínteses do tipo *bottom-up*, que consiste em sintetizar o material por meio da nucleação dos átomos, sendo esta realizada no presente trabalho. A

qualidade do material obtido depende do tempo de nucleação, isso porque um tempo maior implica em maior dispersão de tamanho, devido à formação de vários núcleos distintos com tempo de crescimento diferente (VALE; VIEIRA; SOUSA; FERRARI, 2015).

Os ligantes de superfície (LSs) dos PQs são fundamentais para a estabilização e influência de suas propriedades ópticas. Os passivadores de superfície podem ter origem orgânica ou inorgânica. Os passivadores inorgânicos, recobrem a superfície e são geralmente formados por materiais que possuem maior band gap que o PQ, formando o shell, com o PQ sendo o core (centro). Geralmente estes passivadores modificam o rendimento quântico de luminescência e causam deslocamento batocrômico da banda de emissão (CHEN, X. *et al.*, 2003). Já os passivadores orgânicos atuam na superfície do PQ, realizam ligações covalentes com o cátion, atuam simultaneamente como agentes estabilizantes que evitam nucleação e como agentes de redução dos defeitos de superfície. Contudo, estes estabilizadores são menos estáveis em longos períodos de tempo, ocorrendo fotodegradação com a incidência de luz UV (MA *et al.*, 2007).

Dentre os ligantes de superfície, os grupos polifosfatos, carboxílicos e aminos, por exemplo, permitem que os PQs de CdTe permaneçam estáveis na forma coloidal (MARONESI *et al.*, 2016). O grupamento tiol, por sua vez, funciona como um eficiente passivador de superfície, além de controlar o crescimento. Isso porque eles apresentam um comportamento ligado/desligado em torno dos PQs. Em seu estado “ligado” ele se apresenta conectado à superfície do ponto quântico impedindo o seu crescimento. Já quando em estado “desligado” os ligantes ficam um pouco afastados da superfície, permitindo o crescimento do nanocristal (SILVA, FERNANDA O *et al.*, 2012). É importante ressaltar que esse comportamento dinâmico, de ligado-desligado, pode ser fortemente influenciado pela temperatura da reação, concentração, comprimento da cadeia dos ligantes e também pela escolha adequada dos solventes (JI *et al.*, 2008; PRADHAN *et al.*, 2007). Em geral, os LS apresentam uma parte não-polar (uma longa cadeia de hidrocarbonetos) e um grupo polar terminal (-SH, -PH₃, -COOH, -NH₂). Como exemplos de ligantes para o CdTe, podemos citar o ácido tioglicólico (TGA) (Figura 2- (a)) e o ácido 3- mercaptopropiônico (MPA) (Figura 2- (b)) utilizados no trabalho (JI *et al.*, 2008).

Figura 2 - Ligantes de superfície para CdTe em meio aquoso.



Fonte: Do autor.

Legenda: (a) ácido tioglicólico (TGA) e (b) ácido 3- mercaptopropiônico (MPA).

Uma das aplicabilidades que surgiram com o desenvolvimento de PQs de CdTe coloidais nas duas últimas décadas, é a utilização como marcadores biológicos, sendo possível marcar desde órgãos à componentes intracelulares (MICHALET, 2005). Diversas pesquisas mostram que os pontos quânticos são altamente cotados como substituintes de marcadores orgânicos, devido à sua excelente fotoestabilidade, sendo aproximadamente 100 vezes maior do que os fluoróforos orgânicos (MEDINTZ *et al.*, 2005). Além disso, existe a facilidade em se utilizar somente uma fonte de luz de excitação para diversas cores, alto brilho e marcação simplificada de vários alvos (MASSEY *et al.*, 2015).

Dessa forma, os PQs vêm sendo constantemente estudados como material de marcação celular (KUNDROTAS *et al.*, 2019), um exemplo é o estudo realizado por WU e colaboradores, relatando o tempo de vida e intensidade de emissão dos corantes orgânicos em comparação com pontos quânticos (WU *et al.*, 2003). Para isso, eles marcaram células com pontos quânticos funcionalizados com estreptavidina (que tem como sítio a marcação nuclear) e marcadores orgânicos com marcação microtubular, em seguida o teste foi repetido, mas com marcações invertidas. Os resultados exibiram a eficiência luminescente do ponto quântico frente ao corante orgânico, em relação ao tempo de exposição à célula. É relatado, para os PQs, que sua intensidade permanece a mesma durante todo o teste (duração de 180 segundos), enquanto que o marcador orgânico apresenta fotodegradação a partir de 60 segundos. E com isso, os PQs se mostram mais eficientes na marcação celular e na imagem de fluorescência a longo prazo *in vitro* (WU *et al.*, 2003).

2.2 ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES DE INTERESSE BIOLÓGICO

Estruturas supramoleculares podem ser obtidas pela associação de espécies moleculares, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade (WANG, JINGYU; LI; XU, 2021). Assim, propriedades específicas, tais como automontagem, reconhecimento molecular, transformação, transporte e sinalização podem ser exploradas a partir de modelos (WANG, JINGYU; LI; XU, 2021). A seguir, são destacados os sistemas supramoleculares de interesse no presente trabalho.

2.2.1 Bicamadas lipídicas

As células biológicas e suas organelas são protegidas por membranas, que desempenham papel importante no ambiente celular, responsável por definir os limites de uma célula, separando o citossol (ambiente interior da célula) do ambiente extracelular (BONDAR, 2019). Ademais, algumas células podem ter vacúolos, que são grandes vesículas responsáveis por manter o equilíbrio fluido das membranas e controlar o fluxo de metabólitos, estes vacúolos podem “digerir”, armazenar ou transportar alimentos e resíduos celulares. Embora as membranas possuam uma diversidade de componentes e funções, todas são estruturalmente semelhantes, e se constituem de uma camada fina de lipídios com proteínas, sendo algumas delas responsáveis por regular a passagem de íons e moléculas (WATSON, 2015).

Membranas biológicas possuem espessura em torno de 3-5 nm (DEAMER; BRAMHALL, 1986), e são semipermeáveis. Dessa forma, a passagem de componentes para o meio intracelular pode ocorrer com auxílio ou não de transportadores. Ou seja, existe o transporte ativo, em que não há necessidade de auxílio de proteínas carreadoras para que ocorra (endocitose e exocitose), e nesse caso há a formação de poros lipídicos induzidos por campos externos como estresse ou contato com outras membranas e/ou partículas (KIRSCH; BÖCKMANN, 2016). Mas existe também, o transporte não ativo (passivo), que se utiliza de proteínas que facilitam o transporte (difusão facilitada e osmose), formando poros específicos ou atuando como transportadores (KIRSCH; BÖCKMANN, 2016).

Por isto, grande parte das funções desempenhadas nas membranas dependem de proteínas presentes em sua constituição (PHILLIPS *et al.*, 2009). Para determinadas funções fisiológicas, como a fusão de membranas e determinadas aplicações biotecnológicas, como a transfecção de genes (processo de introdução de ácidos nucleicos nas células), a integridade da

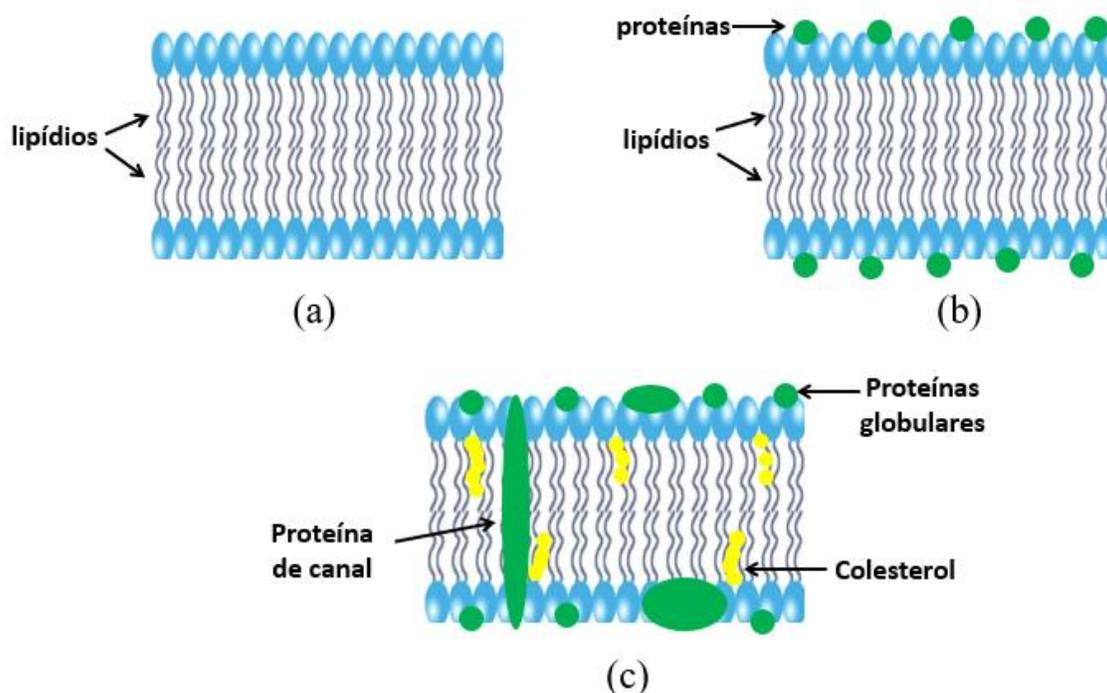
membrana precisa ser “comprometida” para permitir a troca de moléculas através da barreira lipídica (CONTINI *et al.*, 2018; MONTIS *et al.*, 2018).

Existem uma infinidade de interações que podem ocorrer ao colocar determinado material em contato com a célula (ZHOU, H. X.; PANG, 2018). Buscando avaliar e estudar interações de diferentes nanomateriais com a membranas, modelos de membrana podem ser uma ferramenta com o intuito de mimetizar a célula (BAILEY *et al.*, 2015; BHAT *et al.*, 2016; BONDAR, 2019).

A origem do conceito bicamada lipídica, é conhecida a mais de três séculos. Entretanto, o reconhecimento da bicamada lipídica como modelo para biomembranas ocorreu por volta da década de 40 (ASAKA; TI TIEN; OTTOVA, 1999). Tudo começou com o físico e inventor Robert Hooke, que em 1665 aderiu o termo célula para descrever uma unidade da estrutura de uma fatia de cortiça ao observá-la em um microscópio primitivo. Robert Hooke também estudou bolhas de sabão sob o microscópio, e descreveu como observação em 1672, que apareciam em filme de sabão, inicialmente branco, buracos negros que cresciam até ficarem grandes e evidentes, o que demonstrava dificuldade em imaginar o corpo simbólico ou invisível que mantinha a forma da bolha. Algumas décadas depois, Isaac Newton estimou a espessura desses, com valor de 9,5 nm, o que está próximo de medidas atuais de bicamadas de membrana. A observação inicial de "buracos negros" nos filmes de sabão, tiveram uma grande influência no desenvolvimento do conceito de bicamada lipídica de biomembranas e sua realização experimental posterior em membranas de bicamada lipídica (bicamadas lipídicas planas e lipossomas esféricos). Neste contexto, muitas são as discussões recentes sobre as automontagens de moléculas (sistemas auto organizados), ou seja, a agregação de moléculas em estruturas mais ordenadas de forma termodinamicamente estáveis (ASAKA; TI TIEN; OTTOVA, 1999).

A elucidação da bicamada lipídica tal como conhecemos hoje, foi extensivamente estudada no século XX. Primeiramente, Gorter e Grendel em 1925, por meio de um experimento de extração de fosfolipídios, em que observaram que esse componente ao ser misturado com a água, formava uma camada na interface e a parte apolar interagiu com a camada hidrofóbica de outro fosfolipídio (Figura 3-(a)) (MOREIRA, 2014). Dez anos depois, Danielli e Davson (Figura 3-(b)), propuseram que havia interação de proteínas globulares com a parte polar das camadas, no qual é bem próximo da estrutura que se conhece atualmente. Com o avanço da microscopia eletrônica, Robertson em 1960, propôs uma estrutura trilaminar, e que as proteínas eram no formato de alfa-hélice (ENGELMAN, 2005; LOMBARD, 2014; MOREIRA, 2014).

Figura 3 - Modelos de membrana.



Fonte: Da autora.

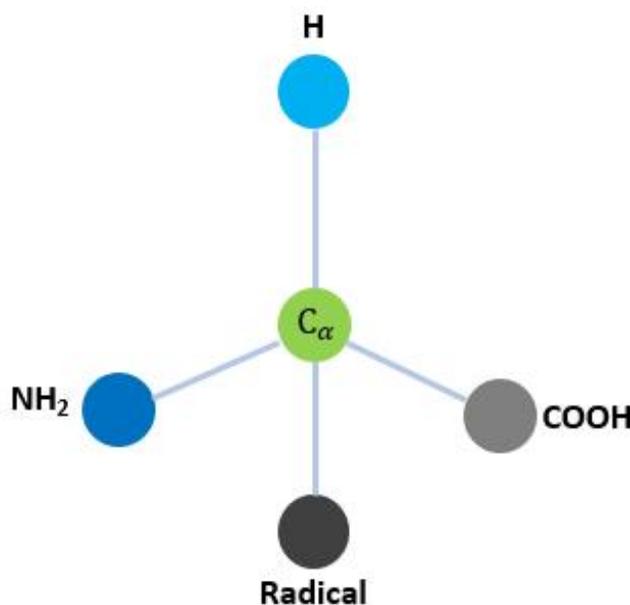
Legenda: (a) Modelo de membrana de Gorter e Grendel (1925); (b) Modelo de membrana de Danielli e Davson (1935) e (c) Modelo de membrana de Singer e Nicolson de (1972).

Ainda com estudos extensivos e com críticas quanto à permeabilidade e rigidez dessas membranas, por volta de 1972, Singer e Nicolson observaram que a membrana se constituía de algumas proteínas em cada um de seus lados na superfície (proteínas periféricas), que auxiliavam no transporte de compostos polares, além da capacidade das mesmas de se deslocar nessa superfície ou a atravessarem inteiramente (proteínas integrais) (Figura 3 – (c)) (MELBY *et al.*, 2018). Esse modelo é o mais aceito atualmente, e é conhecido como modelo do mosaico fluído, cuja a estrutura membranar não é rígida, permite fluidez das moléculas e até a troca de posição dos fosfolipídios entre si (lateral ou transversalmente – “*flip-flop*”) sem perda de contato uns com os outros (MOREIRA, 2014). A partir dos avanços na comunidade científica, hoje o modelo de mosaico fluído é bem aceito e a ele foi incorporado características de proteínas e estruturas que permitem a passagem de componentes e a ligação de outras substâncias na parte extracelular ou intermembranar (SIMONELLI; ROSSI; MONTICELLI, 2019).

2.2.2 Proteínas

As proteínas são moléculas complexas, formadas por aminoácidos naturais ligados entre si, através de ligações peptídicas. São amplamente estudadas por desempenharem funções celulares importantes no meio biológico. Inclusive, grande parte das informações genéticas são determinadas pelas proteínas (ENGELMAN, 2005; HARTWELL *et al.*, 1999; ZHANG, X. *et al.*, 2013). Existem cerca de 20 tipos de aminoácidos a partir do qual as proteínas são formadas (ALMEIDA, 2016). Basicamente, como pode ser observado na Figura 4, os aminoácidos são estruturas formadas por um carbono quiral ou carbono alfa (C_{α}), no qual encontram-se ligados um grupo amina (NH_2), um grupo carboxílico ($COOH$), um átomo de hidrogênio (H) e uma cadeia lateral R (radical). Sendo o radical responsável por distinguir os 20 aminoácidos naturais entre si, além de conferir propriedades físico-químicas distintas as proteínas. Nas proteínas os aminoácidos encontram-se ligados entre si, por ligações peptídicas derivadas da condensação do grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amino do outro (ALMEIDA, 2016).

Figura 4 - Representação esquemática de um aminoácido.



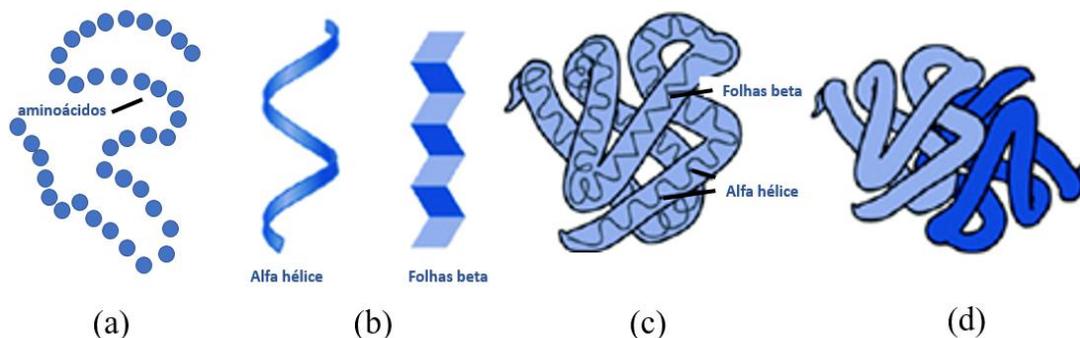
Fonte: Figura adaptada (CAGNIN, 2010).

As proteínas são identificadas pela sua sequência particular de aminoácidos, que lhes confere informações específicas para determinação de sua estrutura 3D particular e funcionalidade. Desse modo, as proteínas são descritas de acordo com os quatro níveis

estruturais: primária, secundária, terciária e quaternária (representadas na Figura 5). A estrutura “primária” (Figura 5 – (a)) é o nível estrutural mais simples e importante e refere-se a estrutura linear tridimensional da sequência de aminoácidos da proteína, pode variar de acordo com o número de aminoácidos, sequência e composição. As estruturas secundárias (Figura 5 – (b)) correspondem a estruturas da cadeia peptídica caracterizadas pelos contatos locais entre aminoácidos, possuem conformação de alfa-hélices e folhas-beta. As α -hélices são estruturas cilíndricas estabilizadas por pontes de hidrogênio entre aminoácidos (se assemelha a uma escada em espiral). Já as folhas- β são associações, lado a lado, de diversas partes da cadeia polipeptídica, formando uma estrutura achatada (JOGLEKAR *et al.*, 2017).

As estruturas terciárias (Figura 5 – (c)) estão relacionadas a forma como os aminoácidos se organizam no espaço. De modo geral, a forma das proteínas está relacionada com sua estrutura terciária (JOGLEKAR *et al.*, 2017). Esta estrutura resulta de interações físicas e químicas que se estabelecem entre as cadeias laterais dos aminoácidos e dessas com o meio aquoso. Essas interações estabilizam termodinamicamente a estrutura de forma apropriada, condição necessária para a efetiva atividade biológica das proteínas. A estrutura terciária está relacionada com as torções e dobraduras da cadeia protéica sobre si mesma e determina a funcionalidade da proteína. Por fim, a estrutura quaternária (Figura 5 – (d)) refere-se ao modo pelo qual duas ou mais cadeias polipeptídicas interagem (KOPEC *et al.*, 2021).

Figura 5 - Representação dos níveis estruturais das proteínas.



Fonte: Figura adaptada (ALMEIDA, 2016).

Legenda: (a) estrutura primária; (b) estrutura secundária; (c) estrutura terciária e (d) estrutura quaternária.

De acordo com os diferentes aminoácidos e com a sequência dos mesmos na cadeia polipeptídica, a partir da qual são formadas, as proteínas adquirem forma e funções diferentes (CAGNIN, 2010). Podendo ser classificadas ainda em três grupos: estruturais, globulares e de

membrana (CAGNIN, 2010). As proteínas estruturais são formadas por longas cadeias lineares de aminoácidos, a formação de micro filamentos as tornam responsáveis por funções estruturais de sustentação. As proteínas globulares fazem parte do material cromossômico e também desempenham papéis diversos, funcionando como anticorpos, atuando na coagulação sanguínea e produção de energia, podem ter ação enzimática, de transporte e função reguladora de hormônios (CAGNIN, 2010). Já as proteínas de membranas, são responsáveis por processos de controle de substâncias que entram e saem da célula, podendo agir como receptoras para substâncias, enzimas catalisadoras de reações na superfície da membrana ou marcadores de células provenientes de outro meio (CAGNIN, 2010).

Assim que são sintetizadas (estado nativo), as proteínas passam por um processo chamado de enovelamento proteico ou folding, processo pelo qual a proteína apresenta seu estado mais estável e a variação de energia livre de Gibbs (ΔG) possui um valor mínimo, garantindo assim sua função biológica (GODOI CONTESSOTO *et al.*, 2018). Entretanto, as proteínas podem sofrer alterações na sua estrutura nativa, ou seja, pode ocorrer o enovelamento incorreto ou desnaturação dessa proteína. Isso pode acontecer devido a alterações genéticas, envelhecimento e outros diferentes fatores, como temperatura, pH, força iônica, entre outros (ALMEIDA, 2016).

As proteínas por exercerem funções reguladoras de transporte, podem afetar diretamente o funcionamento celular ao serem expostas a substâncias distintas (MOTEEVALIAN *et al.*, 2020). Inclusive sua conformação pode ser alterada, estudos tem mostrado que ao entrarem em contato com nanopartículas, está última adsorve proteínas em sua superfície, desencadeando respostas fisiológicas específicas (FOROOZANDEH; AZIZ, 2015). As respostas desencadeadas, dependem das NPs de contato e das proteínas as quais atraem para sua superfície, essa interação dá origem à um complexo denominado de proteína corona (CARACCILO; FAROKHZAD; MAHMOUDI, 2017; MOTEEVALIAN *et al.*, 2020).

Inúmeras pesquisas têm sido feitas para entender como ocorrem processos de interação e marcação celular por nanopartículas de PQs com membranas (BAIMANOV; CAI; CHEN, 2019; CAI; YAO, 2014). Estes estudos visam buscar respostas para questões relacionadas a processos interacionais entre PQs, membranas e seus respectivos componentes. Dentre os componentes membranares, as proteínas de HSA por exercerem funções específicas de transporte, tornaram-se objeto de estudo de processos interacionais com PQs de CdTe com diferentes ligantes de superfície (BAIMANOV; CAI; CHEN, 2019; DU, X. *et al.*, 2016; HU, Y. *et al.*, 2020).

2.3 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ESTUDOS INTERACIONAIS

Diversas técnicas podem ser exploradas para estudos interacionais entre nanomateriais com sistemas supramoleculares. Neste tópico será descrito as principais utilizadas no presente trabalho, tanto para caracterização das nanopartículas sintetizadas, quanto aquelas usadas para obter parâmetros qualitativos e quantitativos da interação de NPs com os sistemas supramoleculares de interesse.

2.3.1 Técnicas de caracterização de nanopartículas

As técnicas utilizadas para caracterização das nanopartículas estão descritas neste tópico e foram utilizadas com o objeto de verificar a formação, tamanho, morfologia e estabilidade das dispersões coloidais obtidas.

2.3.1.1 Espectroscopia na região do UV-Visível (UV-Vis)

As investigações das propriedades eletrônicas das nanopartículas podem ser feitas pela técnica de absorvância, utilizando um equipamento de espectroscopia de UV-vis, que trata de uma caracterização óptica e não destrutiva de nanomateriais, que tem se tornado importante devido ao fato de metais apresentarem banda de plasmom em tamanho nanométrico (LIMA, 2014; QUEVEDO *et al.*, 2021).

A técnica compreende a absorção da radiação ultravioleta/visível, na faixa de 180-780 nm, pela matéria, o que provoca a excitação do elétron do estado eletrônico fundamental para o estado eletrônico excitado (HAES *et al.*, 2005). Dessarte, obtém-se espectros, pela radiação da luz através da solução diluída do nanomaterial, e o espectro é dado pela razão de intensidade da radiação que passa pela amostra e pela referência, na faixa de comprimento de onda selecionado (PASHKOV *et al.*, 2021).

Para análise de NPs, o tamanho das mesmas irá influenciar as propriedades ópticas e eletrônicas (TOMASZEWSKA *et al.*, 2013). Isso porque, os metais na forma bulk, tem propriedades dirigidas por bandas de energia únicas, mas que desviam do comportamento ideal ao terem seu tamanho diminuído, pois o caminho médio dos elétrons excede ao raio da partícula (QUEVEDO *et al.*, 2021). A diminuição do tamanho de partículas aumenta consideravelmente a proporção de átomos que se encontram na superfície do sólido e assim, a densidade de elétrons na superfície é amplificada, o que tem influência direta sob a interação da partícula

com a luz. Quando a luz é amplamente absorvida pelas nanopartículas em determinados comprimentos de onda e é espalhada em outros, dependendo do seu tamanho e morfologia, origina-se o fenômeno da ressonância plasmônica de superfície (BERANEK, 2011). Por esse motivo, a cor da suspensão de nanopartículas metálicas é alterada, como ocorre com o ouro que apresenta colorações diferentes do tradicional dourado (macro), para vermelho sangue ao roxo escuro (BERANEK, 2011; QUEVEDO *et al.*, 2021).

De forma geral, a espectroscopia de UV-vis se baseia em medidas de atenuação sobre a intensidade de um feixe de luz após este atravessar a amostra em análise, o que pode resultar em efeitos de absorção, reflexão ou espalhamento. Experimentalmente, deve-se medir as intensidades luminosas antes e depois do feixe atravessar a amostra, e pode-se então calcular a transmitância (T) da amostra pela equação (3) (BEHZADI *et al.*, 2015):

$$T = I/I_0 \quad (3)$$

No qual, I_0 é a intensidade inicial do feixe de luz e I é a intensidade do feixe após atravessar a amostra. Pode-se dizer que a absorção da luz por uma amostra é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente e a distância percorrida pelo feixe no interior da amostra, conhecida como Lei de Lambert-Beer, dada pela equação (4) (BEHZADI *et al.*, 2015):

$$A = \beta \times L \times c \quad (4)$$

A é a absorbância, L é o caminho óptico que a luz percorre, β é o coeficiente de absorção e c é a concentração da amostra. O fato de existir uma relação linear entre a concentração das espécies absorventes e a absorbância da amostra garante que possa se identificar a quantidade de espécimes presentes (LIMA, 2014).

Já a absorbância pode ser calculada a partir das medidas de intensidades luminosas ou através da transmitância da amostra, a relação dessas grandezas é dada pela equação (5):

$$A = -\log(T) = -\log(I/I_0) \quad (5)$$

Os espectros de absorção são dados em termos de A, T, %T ou 1-T em função do comprimento de onda. A lei de Lambert-Beer é o conceito físico fundamental por trás do

fenômeno da absorção, e pode ser utilizada para obter as concentrações de pontos quânticos, que é um dos resultados imediatos da lei. Por conseguinte, inicialmente obtêm-se os espectros e o comprimento de onda máximo, referente a amostra, para se calcular o tamanho do PQs de CdTe pela equação de Peng (2), descrita anteriormente (LIMA, 2014; WANG, JING *et al.*, 2018; YU, W. W. *et al.*, 2003). A concentração molar da solução aquosa do PQ de CdTe foi determinado pela avaliação do coeficiente de extinção (ϵ), calculado conforme mostrado na equação (6) (LIMA, 2014):

$$E = 3450 \Delta E (D)^{2,4} \quad (6)$$

Em que ΔE é a energia de transição correspondente ao primeiro pico de absorção expresso em eV e D é o tamanho de os PQs de CdTe. Conhecendo tanto ϵ quanto o pico de absorbância da solução de nanocristais, a concentração molar foi calculada aplicando a lei de Lambert-Beer.

2.3.1.2 Espectroscopia de fotoluminescência (PL)

A espectroscopia de fotoluminescência ou espectroscopia de fluorescência (PL) é uma técnica de caracterização utilizada para investigar as propriedades ópticas e eletrônicas de materiais semicondutores e de moléculas. Trata-se de um método de análise não destrutivo, que não existe restrição quanto ao tamanho e espessura da amostra, ela é usualmente uma das primeiras técnicas utilizadas na caracterização e estudo de pontos quânticos (MARONESI *et al.*, 2016). O fenômeno físico envolvido na técnica consiste na interação entre radiação e a matéria. A fonte luminosa utilizada em uma medida de PL pode ser qualquer laser, cuja energia dos fótons excedam a energia do gap do material a ser analisado. Também é necessário que a potência seja suficientemente capaz de excitar um sinal de fotoluminescência adequado (MARONESI *et al.*, 2016).

Quando um fóton, com energia igual ou maior que a energia de gap do material, atinge a superfície de um semicondutor, ocorre a absorção da radiação pelo material e consequentemente a promoção de um elétron da banda de valência para a banda de condução, gerando assim um par elétron-buraco, que se encontram em um nível energético superior ao nível do estado fundamental (MARONESI *et al.*, 2016). Assim, após um curto intervalo de tempo, ocorre uma recombinação radiativa e o elétron excitado retorna à banda de valência, emitindo um fóton cuja energia é a energia do gap do material, e a partir destes fótons é possível

construir um espectro de emissão para cada material analisado (VALE; VIEIRA; SOUSA; FERRARI; *et al.*, 2015).

A potência necessária para obter um bom sinal de PL, depende de fatores como comprimento de onda adotado para a fonte de luz que excitará o material, a taxa de transferência do sistema, a sensibilidade do detector e, principalmente, do material a ser analisado. Além disso, a faixa espectral utilizada na PL costuma variar do UV-próximo ao IR-próximo, de maneira que os sinais obtidos pela absorção no UV-Vis e pela PL possuem uma relação próxima (VALE *et al.*, 2019). Uma série de informações podem ser obtidas pela caracterização de fotoluminescência de PQs como características espectrais, por exemplo, o comprimento de onda do máximo de emissão, a largura a meia altura do espectro e a intensidade de emissão, que nos trazem informações a respeito dos tamanhos dos pontos quânticos e da eficiência de emissão (MARONESI *et al.*, 2016). É verificado que, o tamanho dos pontos quânticos é muito característico do material do qual ele é composto (VALE *et al.*, 2019). E espectros de PQs de diferentes tamanhos e de diferentes materiais, apresentam um deslocamento a medida que muda o tamanho das nanopartículas (VALES *et al.*, 2020). A relação do tamanho com a energia de emissão é um comportamento bem estabelecido na literatura (MARONESI *et al.*, 2016; VALE *et al.*, 2019; WANG, X. *et al.*, 2020), na qual é possível verificar que uma diminuição no diâmetro dos PQs leva a um aumento na energia de gap (VALE *et al.*, 2019).

2.3.1.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (P ζ)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dinamic Light Scattering* - DLS), também chamada de Espectroscopia de Correlação de Fótons (Photon Correlation Spectroscopy, PCS), é amplamente utilizada para a avaliação de tamanho e distribuição de partículas em suspensão (BRANDA *et al.*, 2015; RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020). Trata-se de uma técnica não invasiva, onde é fornecida a média da intensidade de espalhamento de luz das partículas que estão em movimento browniano em um sistema de suspensão coloidal (BRANDA *et al.*, 2015).

Quando uma partícula é iluminada por uma fonte de luz, no caso um laser, ela irá espalhar luz em todas as direções. Dessa forma, a técnica de DLS consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo. Essa análise fornece informações sobre o movimento browniano da partícula (aleatório), que é a causa das flutuações da intensidade (BHATTACHARJEE, 2016; TOMASZEWSKA *et al.*, 2013). O movimento Browniano, é usado pois apresenta características que possibilitam a estimativa do tamanho das

partículas, como o fato de partículas pequenas apresentarem movimento rápido e partículas grandes apresentarem movimento lento (RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020).

Para amostras diluídas e monodispersas, isto é, com partículas não-interagentes em movimento Browniano, é possível extrair o coeficiente de difusão translacional da partícula (D_T). Geralmente, as partículas passam a ser consideradas como esféricas e simétricas, além de não permeáveis ao solvente, como por exemplo, polímeros, nanopartículas e vesículas lipídicas em suspensão. Para cálculo do diâmetro efetivo (D_{ef}) ou hidrodinâmico, usa-se a equação (7) de Stokes-Einstein (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016):

$$D_{ef} = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_T} \quad (7)$$

Aqui temos K_B a constante de Boltzmann, T a temperatura e η a viscosidade do solvente. Para obtenção do diâmetro efetivo, leva-se em consideração, o diâmetro da partícula associada a contra-íons e camadas de hidratação que difundem junto com a partícula (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

Entretanto, a maioria dos sistemas de estudo não são monodispersos, e a dispersão contém partículas de diferentes tamanhos, ou seja, diferentes coeficientes de difusão, correspondendo a diferentes taxas. Deste modo, supõe-se que as diversas taxas presentes na amostra são distribuídas segundo uma função característica do sistema. Como resultado de análise, se obtém uma representação de uma distribuição genérica e vários métodos podem ser utilizados para estimar a forma da distribuição em amostras polidispersas, como a método da expansão em cumulantes (KOPPEL, 1972), método Contin (PROVENCHER, 1982) e o método de ajuste por multi-exponenciais (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

O equipamento geralmente utilizado é o Zetasizer Nano ZS90, da *Malvern*. Sendo um aparelho simples, compacto, tendo em seu interior o LASER HeNe 11 de potência 4 mW, $\lambda=633$ nm, atenuador, detector, correlator, e o controle de temperatura. Para realização de análises é necessário ligar o laser 30 minutos antes da realização de medidas. Neste equipamento é possível realizar medidas com o detector a 90° do feixe incidente. Este equipamento dispõe de alguns softwares para a aquisição e análise de dados e vários parâmetros, como intensidade do laser, são automaticamente ajustados pelo software no início do experimento. E dependendo da amostra, várias medidas são feitas, e a média dos resultados obtidos é informada.

Existem várias vantagens da técnica de DLS, como: simplicidade, sensibilidade e seletividade para NPs, curto tempo de medição e além disso, a calibração não é necessária. Essa

técnica é cada vez mais utilizada para caracterização de NPs em muitos campos da ciência e da indústria (LIN *et al.*, 2014). Apesar da técnica DLS ser amplamente utilizada para caracterização de partículas, existem alguns problemas no caso de medição de amostras com distribuição não uniformes (TOMASZEWSKA *et al.*, 2013). Se o colóide medido for monodisperso, o diâmetro médio de NPs pode ser determinado usando a técnica de DLS. No caso de coloides polidispersos, existe o risco, durante a análise de pequenas partículas não serem detectadas devido a presença de partículas maiores (RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020).

O Zetasizer Nano Series ZS90 é um equipamento multifuncional que apresenta capacidade de medir dois parâmetros principais: tamanho de partícula e potencial zeta. O potencial zeta ($P\zeta$) pode ser descrito como o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento entre a partícula em fluxo e o solvente (VORÁČOVÁ *et al.*, 2015). É um parâmetro determinado através de medidas eletrocinéticas, experimentos em que a relação entre a corrente ou voltagem e o fluxo relativo das fases em dispersão. O $P\zeta$ é determinado pelo potencial da superfície das partículas e pela dupla camada elétrica formada por contra-íons e íons, que formam a camada de Stern, contra-íons fortemente ligados à superfície da partícula, e parte da camada difusa (RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020). A distribuição de íons na camada difusa é dependente da concentração do eletrólito, da carga formal dos íons e do solvente, e assim, o potencial é decorrente das contribuições da partícula e do solvente em que a partícula foi inserida (VORÁČOVÁ *et al.*, 2015).

O $P\zeta$ é obtido pela medição óptica da velocidade de movimento da partícula carregada em um líquido quando um campo elétrico é aplicado. A aplicação de campo elétrico na amostra resulta na atração das partículas carregadas dispersas no eletrólito para o eletrodo de carga oposta. A resistência à migração das partículas está associada à viscosidade do meio e tende a se opor à movimentação induzida pelo campo elétrico (TANTRA; SCHULZE; QUINCEY, 2010). Quando o equilíbrio é alcançado, as partículas movem-se em velocidade constante e para cálculo do potencial zeta, em conjunto aos dados da velocidade da partícula e campo elétrico aplicado, são utilizadas duas constantes conhecidas da amostra: viscosidade e constante dielétrica, conforme equação (8) de Henry (DOANE *et al.*, 2012; SKOGLUND *et al.*, 2017):

$$U_E = \frac{2\epsilon P\zeta f(k_a)}{3\eta} \quad (8)$$

Em que $P\zeta$ é potencial zeta, U_E é a mobilidade eletroforética, ϵ é a constante dielétrica, n é a viscosidade e $f(k_a)$ é a função de Henry.

A técnica opera apresentando boa repetibilidade, reprodutibilidade e precisão nas medidas. As concentrações das amostras a serem preparadas para análise depende do diâmetro esperado de partícula, que pode variar entre 3,8 nm até 100 μm (TANTRA; SCHULZE; QUINCEY, 2010).

O potencial zeta é o potencial de superfície aparente que está relacionado à carga de superfície de uma amostra e pode determinar o comportamento de partículas em um líquido e a tendência em agregação e/ou floculação (SKOGLUND *et al.*, 2017). Assim, o $P\zeta$ é um parâmetro importante para avaliar ao estudar NPs em suspensão, pois afeta, por exemplo, a aglomeração de partículas, sedimentação, interação e complexação com outros constituintes do meio, parâmetros que podem influenciar o efeito biológico de NPs (RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020; SKOGLUND *et al.*, 2017).

Como vantagens, a técnica de potencial zeta por mobilidade eletroforética permite determinação de tamanho e agregação de proteínas, análise de emulsões e vesículas no ambiente nativo da amostra, sem alteração ou destruição destes sistemas, permitindo a previsão da estabilidade de emulsões em ambientes alvo (DOANE *et al.*, 2012). Outra possibilidade de aplicação é a verificação de potencial zeta em pigmentos para desenvolvimento de formulações, influenciáveis pelo tamanho e interações eletrostáticas, as quais impactam em propriedades relacionadas a colorimetria, adesão e estabilidade dos sistemas (TANTRA; SCHULZE; QUINCEY, 2010).

2.3.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os microscópios eletrônicos atuais permitem obter informações estruturais e morfológicas de nanomateriais. Eles fornecem inúmeras dados qualitativos de identificação e localização de elementos químicos, além de dados quantitativos como conteúdo iônico e estrutural de NPs em estudo (WEIR *et al.*, 2008). A radiação utilizada na microscopia eletrônica é proveniente de um feixe de elétrons que são refratados por meio de lentes eletrônicas em um sistema de vácuo. Esse feixe de elétrons interage com a matéria, resultando em vários fenômenos, tais como, espalhamento elástico, elétrons retro-espalhados, espalhamento inelástico, elétrons absorvidos, elétrons secundários, raios-X, além do feixe que é transmitido (BUHR *et al.*, 2009).

O fenômeno responsável pelo contraste no microscópio eletrônico de transmissão (MET) é o espalhamento elástico, pois parte desses elétrons são barrados pela abertura da lente objetiva (SUZUKI; YAGUCHI; ZHANG, 2013). A imagem bidimensional é projetada num anteparo recoberto com um material que fluoresce quando irradiado com elétrons. Essa técnica permite calcular o tamanho médio das nanopartículas a partir das imagens obtidas, sendo uma técnica que fornece as dimensões físicas independentemente da estrutura cristalográfica da amostra, incluindo fases amorfas (BUHR *et al.*, 2009; LEE, K. X. *et al.*, 2020). A contagem das NPs, geralmente, é feita com o software denominado Image-J, podendo-se obter um histograma de distribuição de tamanho (PYRZ; BUTTREY, 2008).

O MET é constituído, basicamente, por uma fonte de elétrons que são acelerados ao longo de uma coluna composta de lentes eletromagnéticas e aberturas que definem o caminho, intensidade, entre outros do feixe eletrônico que projeta elétrons através de uma fatia muito fina do material a ser analisado (normalmente da ordem de 70-100 nm de espessura), para produzir uma imagem bidimensional em uma tela fosforescente ou filme fotográfico. O brilho de uma área em particular é proporcional ao número de elétrons que são transmitidos através do material (KRIVANEK *et al.*, 2010). Os filamentos mais utilizados nesse equipamento são de tungstênio e hexaboreto de lantânio, além de que canhões de emissão de campo (FEG) também podem ser utilizados.

A formação da imagem no MET depende basicamente do tipo de espalhamento que o feixe eletrônico sofre ao atravessar o material e de sua espessura. Diferente do MEV, no MET os elétrons espalhados inelasticamente (por exemplo, os elétrons secundários), não são de grande interesse e são excluídos da análise pela lente objetiva. Os sinais mais importantes para o MET estão relacionados ao contraste massa/espessura (que vem do espalhamento que os elétrons sofrem ao se aproximarem de núcleos atômicos), ao contraste de fase (espalhamento dos elétrons em pequenos ângulos) e ao contraste de difração (espalhamento dos elétrons que dependem da estrutura cristalina do material). Também existem outras distinções básicas entre as técnicas, como por exemplo, a intensidade do feixe e a forma como ele é controlado, o fato da coluna de MET ser maior que a de MEV devido ao grande número de lentes (BUHR *et al.*, 2009). A preparação de amostras de catalisadores para MET é relativamente simples, para catalisadores em pó, o material é disperso em álcool etílico ou isopropílico e a suspensão formada deve ser sonicada por alguns minutos. Uma ou mais gotas são então depositadas em um suporte (que chamamos de grid, ou grade) e, após a evaporação do solvente, estão prontas para a análise (BUHR *et al.*, 2009; SMITH, 2015). Os grids, ou grades, são discos que apresentam uma malha fina. Esses discos podem ser feitos de diversos materiais, entre eles Cu,

Mo, Ni, Co, entre outros. A malha pode variar muito dependendo da aplicação a que se destinam, mas é geralmente de cerca de 15 quadrados por milímetro (400 por polegada). No topo desta grade, uma fina camada de carbono é depositada por evaporação de carbono. É nesta película fina de carbono que a amostra irá descansar até que ela possa ser examinada no microscópio (BUHR *et al.*, 2009). Em catálise, o MET pode ser utilizado para fornecer uma imagem em campo claro e escuro referente a estrutura e morfologia do material analisado. Um detector de raios X, para o estudo da composição elementar da amostra, também pode ser integrado a este equipamento (BUHR *et al.*, 2009).

2.3.1.5 Difração de raios x (DRX)

A Difractometria de Raios x (DRX) é uma técnica de caracterização de estruturas cristalinas. Sua origem remonta ao início do século XX, com a descoberta dos raios-X pelo físico alemão Wilhelm C. Röntgen, em 1895. Desde então, vários estudos foram feitos até chegarmos à técnica de difratometria de raios-X, na qual a grade de difração é um cristal de algum composto químico, e os componentes da rede são átomos ou moléculas do composto em questão. Cada átomo ou molécula ocupa um ponto da rede, e a menor unidade do cristal que mantém sua simetria é denominada de célula unitária. A célula unitária contém toda a informação sobre a geometria do cristal, uma vez que este pode ser construído a partir de múltiplas cópias desta célula unitária transladadas tridimensionalmente (AMEH, 2019). O espaçamento entre dois pontos da rede característicos dos cristais é da ordem de 10^{-10} m, que equivale ao comprimento de onda característico das radiações eletromagnéticas na faixa espectral dos raios-X (JENDRZEJEWSKA, 2020).

Na cristalografia ao conhecer a forma do padrão de difração, pode-se inferir sobre a estrutura cristalina do material (JENDRZEJEWSKA, 2020). Existem sete diferentes tipos de redes cristalinas (Triclínico, Monoclínico, Ortorrômbico, Tetragonal, Romboédrico, Hexagonal e Cúbico), conhecidas como redes de Bravais (Auguste Bravais, 1811-1863), que por sua vez dão origem a 14 tipos diferentes de estruturas cristalinas (AMEH, 2019).

Variando-se parâmetros envolvidos na técnica de difração de raios-X, é possível avaliar diferenças na estrutura interna de nanomateriais (JO; KANG; KIM, 2021). O parâmetro que normalmente faz a diferença entre uma técnica de DRX e outra é a forma da amostra. Há difratômetros que utilizam uma amostra sólida e outros que investigam um analito na forma pulverizada (BENMORE, 2012). Os difratômetros que utilizam a amostra na forma de pó possuem um detector móvel, capaz de girar em torno do material estudado, de modo que vários

ângulos de reflexão sejam varridos. Este mecanismo é capaz de captar os raios refletidos em vários ângulos e são detectadas as diferenças na intensidade do feixe refletido em função do ângulo de reflexão, que pelas leis da reflexão é igual ao ângulo de incidência. Para os ângulos nos quais os feixes refletidos interferem construtivamente, é detectado um máximo de reflexão que pode ser medido em contagens por segundo (cps), para os demais ângulos, apenas é detectada a radiação de fundo. O gráfico da intensidade do feixe de raios-X detectado versus ângulo de incidência é chamado de difratograma (FILHO; CARVALHO, 2013).

Difratogramas de nanomateriais fornecem inúmeras informações sobre a estrutura cristalina, natureza da fase, parâmetros de rede e tamanho de grão cristalino (MOURDIKOUUDIS; PALLARES; THANH, 2018). A difração de raio x, leva em consideração um feixe monocromático, com determinado comprimento de onda (λ), que incide sobre um cristal constituído por planos paralelos (hkl) de átomos arranjados periodicamente no espaço, a um determinado ângulo θ (ângulo de Bragg). Os elétrons do átomo desse cristal são excitados e vibram na mesma frequência dos raios-x incidentes e ocorre que o feixe difratado também formará com os planos do cristal um ângulo θ , conseqüentemente os feixes difratados sairão paralelos. Para que as ondas difratadas interfiram construtivamente, é preciso que a diferença entre os caminhos percorridos pelos feixes ou ondas de raios-x, em dois ou mais planos paralelos (hkl), seja um múltiplo inteiro do comprimento de onda. Essa relação é conhecida como Lei de Bragg e é descrita pela equação (9) (FILHO; CARVALHO, 2013).

$$n\lambda = 2d_{hkl}\text{sen}\theta \quad (9)$$

Neste caso, n é número inteiro; λ é o comprimento de onda (nm); d_{hkl} é a distância interplanar de um plano (hkl) específico (m) e por fim, θ é o ângulo de difração ($^{\circ}$).

A difração de raios x (DRX) é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de pontos quânticos (JO; KANG; KIM, 2021). Normalmente, o DRX, além de fornecer informações sobre a estrutura cristalina, pode também determinar o tamanho de grão cristalino. O tamanho pode ser estimado usando a equação de Scherrer, usando o alargamento do pico mais intenso de uma medição de DRX para uma amostra específica (JO; KANG; KIM, 2021; MOURDIKOUUDIS; PALLARES; THANH, 2018). A composição das partículas pode ser determinada comparando a posição e a intensidade dos picos com os padrões de referência disponíveis no banco de dados do International Center for Diffraction Data (ICDD, anteriormente conhecido como Joint Committee on Powder Diffraction Standards, JCPDS). No

entanto, não é adequado para materiais amorfos, e os picos de DRX são muito amplos para partículas com tamanho inferior a 3 nm (BENMORE, 2012; MOURDIKOU DIS; PALLARES; THANH, 2018).

2.3.1.6 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FITR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FITR) é uma técnica analítica que fornece o grupo funcional, tipo de ligação e conformação molecular de compostos orgânicos e inorgânicos (RAMOHLOLA *et al.*, 2020). Quando a amostra é irradiada com uma fonte de luz infravermelha, as ligações químicas que mantêm os átomos juntos absorvem essa radiação em frequências que combinam com seus modos de vibração, diferentemente da espectroscopia UV-vis ou PL, onde os elétrons são excitados no processo de absorção. Os modos de vibração que podem ocorrer quando a luz é irradiada incluem esticar, torcer, dobrar, balançar, abanar ou deformações fora de fase ou em fase que ocorrem entre os números de onda de 400–4000 cm^{-1} (DUYGU *et al.*, 2009). A mudança nos modos vibracionais dará então origem a um espectro com banda, em que cada banda espectral representa um ambiente químico diferente (DUYGU *et al.*, 2009; RAMOHLOLA *et al.*, 2020). O componente mais importante na configuração instrumental do FITR é o interferômetro, que torna o FITR diferente da espectroscopia dispersiva de espectroscopia de infravermelho (IR) tradicional (RAMOHLOLA *et al.*, 2020). O interferômetro possui espelhos fixos e móveis/translantes, bem como um divisor de feixe. Quando a luz de uma fonte chega, o interferômetro a divide em duas partes. Uma parte da luz dividida é refletida para o espelho fixo e então redirecionada para o divisor de feixe, onde vai para o sistema de detecção. A outra luz é refletida para o espelho móvel e depois de volta para o divisor de feixe e para o detector (RAMOHLOLA *et al.*, 2020). Quando essas luzes se encontram, ocorre interferência construtiva ou destrutiva (BARTH, 2007; FAGHIHZADEH *et al.*, 2016).

Os FITR possuem diferentes modos de operação, como reflexão total atenuada (ATR), nujol e brometo de potássio (KBr). Entre esses modos operacionais, o ATR é o mais utilizado, pois evita problemas de manuseio, complexidade de preparação de amostras e irreprodutibilidade espectral (LIN *et al.*, 2014; RAMOHLOLA *et al.*, 2020). Este ATR-FTIR usa a reflectância interna total (TIR) de um elemento de cristal como Ge ou diamante (MINNES *et al.*, 2017). Em princípio, a amostra é colocada em um cristal ATR e o feixe IR da fonte de luz entra no elemento ATR em um determinado ângulo que corresponde ao ângulo crítico entre a amostra e o elemento (BARTH, 2007). A luz então sofre reflectância interna total que forma

uma onda evanescente que se estende além do ATR (BARTH, 2007; MINNES *et al.*, 2017). A onda evanescente é absorvida pela amostra e chega ao detector que gera o espectro de infravermelho, este espectro é um gráfico da porcentagem de transmitância (%T) versus o número de onda ($\tilde{\nu}$) (RAMOHLOLA *et al.*, 2020), e o número de onda pode ser relacionado à energia (ΔE) pela equação (10):

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu} \quad (10)$$

Na equação ν é a frequência (Hertz), c é a velocidade da luz ($2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$), e h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$).

A espectroscopia de infravermelho fornece importantes informações devido à excitação de transições vibracionais fundamentais, inerentemente específicas características de espécies moleculares. Nanopartículas de natureza diversa podem ser caracterizadas e determinadas usando diferentes técnicas espectroscópicas na faixa do infravermelho. Os pontos quânticos com absorções de infravermelho inerentes ou grupos funcionais (MPA ou TGA) presentes em sua superfície, podem assim ser caracterizadas diretamente por meio de espectroscopia de infravermelho (FAGHIHZADEH *et al.*, 2016; LÓPEZ-LORENTE; MIZAIKOFF, 2016). Além disso, diferentes ligantes conectados as nanopartículas podem ser facilmente identificados, de acordo com suas assinaturas vibracionais, de forma rápida, precisa e não destrutiva (LÓPEZ-LORENTE; MIZAIKOFF, 2016).

2.3.2 Técnicas e métodos eletroquímicos

Os métodos eletroanalíticos usam propriedades elétricas mensuráveis como corrente elétrica, carga e potencial de um determinado analito, quando sobre este é aplicado uma diferença de potencial entre eletrodos de uma cela eletroquímica (ELGRISHI *et al.*, 2018). É considerada uma técnica dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial. As propriedades elétricas surgem a partir de fenômenos nos quais a espécie redox de estudo interage física ou quimicamente com os componentes do meio, ou com suas interfaces (SCHOLZ, 2015). Os sinais eletroanalíticos obtidos podem ser relacionadas com algum parâmetro químico da espécie.

Espécies carregadas positiva ou negativamente são atraídas pelo eletrodo, que irão ou não reagir com a superfície do mesmo. E espécies neutras também podem reagir por adsorção (SCHOLZ, 2015). Assim, as reações que ocorrem na superfície do eletrodo são caracterizadas por uma série de processos, em que se deve considerar o transporte das espécies até a superfície do eletrodo e a reação que ocorre no mesmo. E a corrente ou a velocidade de reação eletródica é governada por processos como a transferência de massa (transferência da espécie do corpo da solução para a interface eletrodo-superfície) que deve ser contínuo, para que a concentração da espécie eletroativa de interesse na superfície do eletrodo não diminua rapidamente, prejudicando a relação da concentração do analito no seio da solução. O transporte de massa pode ocorrer de três formas: por migração (movimento de íons através da solução causada pela atração ou repulsão entre as espécies iônicas em solução e o eletrodo de trabalho); convecção (movimentação das espécies causadas por perturbação mecânica do fluxo da solução) que deve ser minimizadas e por difusão (movimentação espontânea da espécie química devido à formação de um gradiente de concentração do analito de interesse) (BARBOSA *et al.*, 2014).

A corrente ou a velocidade de reação eletródica também podem sofrer influência da transferência de carga, devido reações eletródicas como processos de oxidação e redução, que ocorrem na interface eletrodo-solução e que geram uma corrente elétrica (PACHECO *et al.*, 2013). Quando a superfície do eletrodo de trabalho está imersa na solução de eletrólito, está irá alterar a camada de solução vizinha da superfície do eletrodo, produzindo uma orientação das moléculas e criando uma contra camada elétrica cuja densidade de carga é igual ao eletrodo de trabalho, porém com sinal oposto, de forma a manter a neutralidade elétrica do sistema. Esta interface formada por duas lâminas de carga oposta em sinais é denominada de dupla camada elétrica, e não possuem mobilidade estando especificamente adsorvidas no eletrodo (plano interno de Helmholtz ou camada interna) (PACHECO *et al.*, 2013). Além dessa camada, há uma região na qual as moléculas solvatadas da espécie eletroativa de estudo estão presentes, entretanto, devido ao seu raio de hidratação, não conseguem atingir a superfície do eletrodo (camada difusa) (PACHECO *et al.*, 2013).

Na camada difusa, as moléculas solvatadas do analito possuem determinada mobilidade e sofrem atração do eletrodo através de interações de longa distância. A concentração de analito na camada difusa é proporcional à concentração de analito no seio da solução, o que proporciona um aspecto quantitativo na medida de corrente gerada pela interação do analito/eletrodo (ELGRISHI *et al.*, 2018; PACHECO *et al.*, 2013). As moléculas no seio da solução não sofrem nenhum tipo de interação com o eletrodo. Normalmente, a transferência de carga se dá quando analito atinge a camada difusa, entretanto, pode ocorrer a adsorção

específica no eletrodo, em que o analito chega até a camada interna compacta substituindo moléculas do solvente. A corrente observada na interação do analito com o eletrodo é denominada de faradáica, e é proporcional à concentração de analito no seio da solução (ELGRISHI *et al.*, 2018). O outro tipo de corrente, é a capacitiva, que não é proporcional à concentração do analito e é não faradáica, é apenas uma corrente gerada pela presença de acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo, aumentando a carga da dupla camada elétrica (ELGRISHI *et al.*, 2018).

Por fim, a corrente ou a velocidade de reação eletródica também são influenciadas pelas reações químicas que precedem ou sucedem a transferência de elétrons, que podem ser homogêneos (protonação, dimerização, entre outras) ou heterogêneos (decomposições catalíticas, adsorção, dessorção, cristalização) (BARBOSA *et al.*, 2011; ELGRISHI *et al.*, 2016; PACHECO *et al.*, 2013).

Existe uma série de técnicas eletroanalíticas que têm sido amplamente empregadas no avanço de plataformas de sensores baseadas em nanomateriais devido resposta rápida, alta sensibilidade, seletividade e baixos limites de detecção (PACHECO *et al.*, 2013). Portanto, são usadas para detecção rápida e sensível, por exemplo, de poluentes ambientais ou contaminantes, como um grande grupo de produtos químicos não regulamentados, como metais pesados, ânions inorgânicos, compostos fenólicos, pesticidas e reagentes de guerra química, que podem cumulativamente causar graves danos a saúde humana e ao meio ambiente (JIN; MADURAIVEERAN, 2018). As técnicas voltamétricas também podem ser uma alternativa aos métodos espectrométricos usados com mais frequência (PACHECO *et al.*, 2013).

Basicamente, técnicas de voltametria se caracterizam pelos fenômenos que ocorrem entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície, devido a relação do potencial aplicado e a corrente de difusão ou faradáica que pode estar relacionada a concentração das espécies de interesse. A forma como o potencial é aplicado e a forma como a corrente será adquirida denominará o tipo de técnica de voltamétrica a ser utilizada. As técnicas voltamétricas subdividem em Voltametria de varredura linear ou cronoamperometria de varredura de potencial linear, em que o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia linearmente com o tempo, permitindo o uso de velocidades de varredura altas (até $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), no entanto não é uma técnica muito sensível (PACHECO *et al.*, 2013). Na técnica de Voltametria por pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos são aplicados ao eletrodo de trabalho e a corrente é medida duas vezes, o que torna esta técnica mais sensível e rápida que a anterior. Têm-se também a Voltametria de onda quadrada, em que a corrente é medida duas vezes o que garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre

a corrente total, a sensibilidade desta técnica é comparável com da voltametria de pulso diferencial (PACHECO *et al.*, 2013).

Podemos citar também, a Voltametria de redissolução e Voltametria adsorviva de redissolução (ADSV), em que uma reação eletroquímica entre o analito e o eletrodo de trabalho ocorre antes da varredura e aquisição de sinal iniciar. Devido a essa reação, o analito pode ser pré-concentrado no eletrodo de trabalho. Como resultado, há um aumento da magnitude da corrente medida, com diminuição significativa dos limites de detecção para as espécies químicas (PACHECO *et al.*, 2013). Em particular a ADSV, é baseada na capacidade que alguns compostos orgânicos e inorgânicos têm de se adsorverem na superfície do material eletrodico. A técnica possibilita a deposição do analito sobre o eletrodo de trabalho e ganho no limite de detecção. E por fim, temos a técnica de Voltametria cíclica (VC), mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta de sua característica de fornecer informações rapidamente sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorvivos (ELGRISHI *et al.*, 2016).

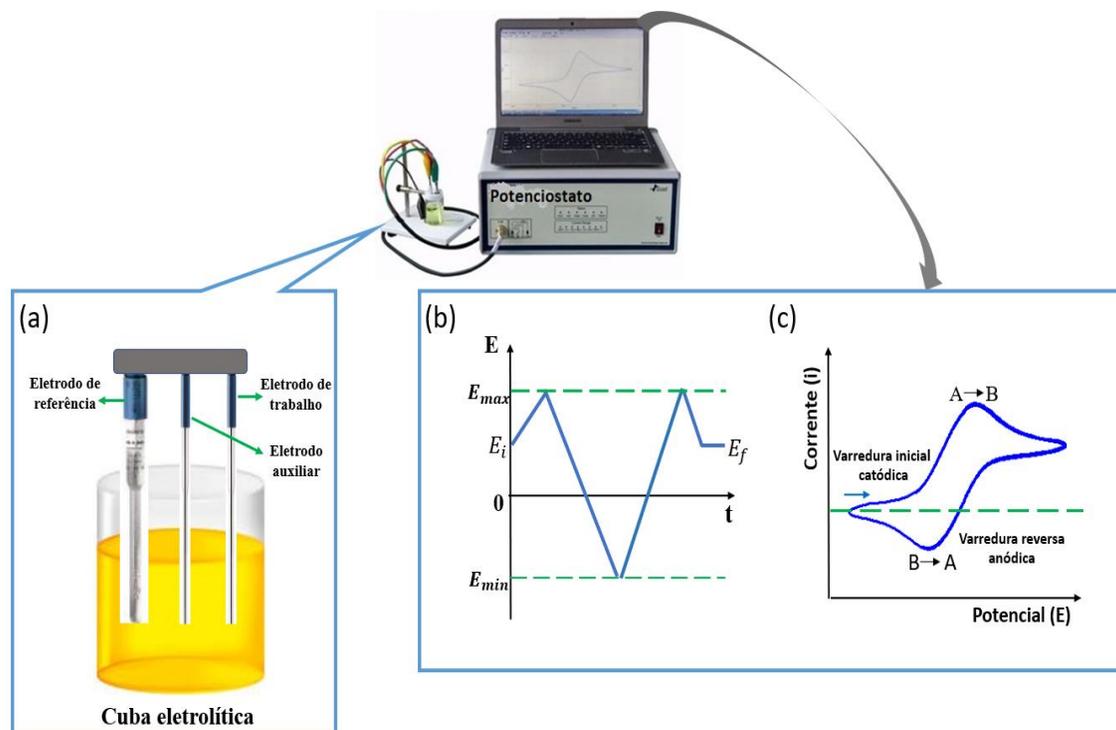
Por essas características, a VC tem permitido o conhecimento do mecanismo de reações de agentes farmacêuticos, fornecendo pistas úteis na elucidação dos mecanismos de interação com células vivas (OZKAN; USLU, 2016). Um exemplo é a análise voltamétrica e polarográfica de medicamentos em preparações farmacêuticas (HONEYCHURCH, 2019; REDDY; REDDYPRASAD; SREEDHAR, 2013). Por isso, a técnica de voltametria cíclica, tem se tornado importantes para avaliar qualitativamente interações entre nanopartículas com membranas e/ou tecidos biológicos, permitindo avaliar processos interfaciais, uma vez que o entendimento de mecanismos de interação é de fundamental importância para aplicações biomédicas futuras (NARESH; LEE, 2021; REDDY; REDDYPRASAD; SREEDHAR, 2013). O tipo de processos interfaciais e superficiais é de grande relevância na escolha do método de imobilização de espécies sobre a superfície de eletrodos, além do reconhecimento de problemas associados aos métodos de imobilização (SCHOLZ, 2015). Além disso, podem contribuir afim de definir vantagens e desvantagens sobre seu uso (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016; MAGAR; HASSAN; MULCHANDANI, 2021).

2.3.2.1 Voltametria Cíclica

A Voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas

corrente x potencial, feitas durante a eletrólise da espécie química em uma cela eletroquímica (PACHECO *et al.*, 2013). Basicamente, a VC consiste na aplicação de um potencial variável em função do tempo com uma determinada velocidade de varredura de potenciais, em um processo cíclico. A técnica é constituída pelo uso de três eletrodos, como representado na Figura 6 - (a). Dessa forma, a cuba eletrolítica deve conter o eletrodo de trabalho, em que ocorre a reação de estudo com aplicação de determinado potencial. Há também o eletrodo de referência (Ag/AgCl), com grande área de superfície, na qual não há fluxo de corrente, e por fim o circuito deve contar com um eletrodo auxiliar (contra eletrodo) que pode ser de platina, ouro, carbono vítreo entre outros (ELGRISHI *et al.*, 2018; PACHECO *et al.*, 2013). Como a área dos dois eletrodos é diferente, o eletrodo de trabalho se polarizará, isto é, assumirá o potencial aplicado a ele. O eletrodo de referência, por possuir uma área maior, não se polarizará, mantendo o seu potencial constante. Para aumentar a polarização, usa-se microeletrodos como eletrodos de trabalho. Esses microeletrodos possuem áreas superficiais máximas de alguns poucos milímetros quadrados e, em algumas aplicações, de poucos micrômetros quadrados ou menos (PACHECO *et al.*, 2013).

Figura 6 - Representação esquemática para técnica de Voltametria cíclica.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Cubal eletrolítica com seus componentes conectados ao potenciostato; (b) Formato do varrimento de potencial com o tempo na voltametria cíclica e (c) Voltamograma genérico para a reação $A \rightarrow B$.

O potencial é aplicado entre os eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo (Figura 6 – (b)), em uma solução sem agitação. O varrimento de um potencial começa em um potencial inicial (E_i) até o potencial máximo ($E_{m\acute{a}x}$), ou potencial de inversão, onde a direção do varrimento é então invertida até o valor final ($E_{m\grave{i}n}$). Pode ocorrer a repetição do ciclo e o potencial final ($E_{m\grave{i}n}$) pode se tornar o novo potencial de inversão. Dependendo da informação desejada, simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente *versus* o potencial aplicado. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente (Figura 6 – (c)). O registro da corrente em função do potencial é chamado de voltamograma. O pico de corrente na curva resultante se refere a reação no eletrodo, e na faixa de potencial estudado, faz-se necessário que a espécie química seja capaz de sofrer oxidação e redução, além do uso de um solvente estável.

A resposta do sistema eletroquímico à perturbação, depende da velocidade de varredura e do intervalo de potencial estudado. Por exemplo, com o aumento da velocidade de varredura de potencial, há menor tempo para as espécies eletroativas alcançarem o equilíbrio na superfície do eletrodo e, assim, reações que parecem reversíveis a baixas velocidades de varredura podem ser quase irreversíveis a altas velocidades. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo (CAMPBELL; COMPTON, 2010; OZKAN; USLU, 2016). A voltametria cíclica é uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos e uma técnica bastante versátil no estudo de mecanismos de reações e de identificação de espécies em solução (OZKAN; USLU, 2016).

A técnica de Voltametria é comumente utilizada pela química analítica, mas também apresenta ampla aplicação para diversas áreas, como a bioquímica, inorgânica e físico-química, onde pode-se aplicar o método para analisar mecanismos de transferências de elétrons em superfícies de eletrodos quimicamente modificados, adsorção em superfícies e análises fundamentais de processos de redução e oxidação em vários meios (BARBOSA *et al.*, 2014; PACHECO *et al.*, 2013). No entanto, a aplicação de voltametria na elucidação de mecanismo de ação de substâncias sobre membranas de bicamada lipídica, ainda encontra-se pouco difundida, porém com perspectivas de aumento significativo devido às diversas vantagens inerentes das técnicas voltamétricas (BARBOSA *et al.*, 2011; SCHOLZ, 2015).

A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos (LEE, K. J. *et al.*, 2017). Um exemplo de processo eletroquímico que ocorre na interface eletrodo solução está

representado na reação: $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$; onde Ox é a forma oxidada com carga, Red é a forma reduzida com carga e ne^- é o número de elétrons envolvidos no processo de oxi-redução (ELGRISHI *et al.*, 2016)

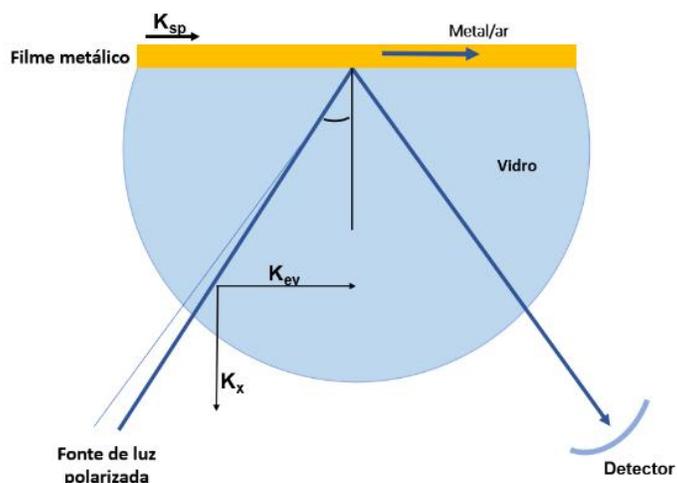
2.3.3 Técnica de ressonância plasmônica de superfície

A técnica ressonância plasmônica de superfície (do inglês, Surface Plasmon Resonance - SPR), foi lançada comercialmente em 1990, o que permitiu estudos de interação entre proteína-peptídeos, proteína-DNA, proteína-polissacarídeos e proteína-nanopartículas (MASSON, 2020). A técnica permite a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação entre compostos em tempo real. Por isso, torna-se uma alternativa para compreender processos moleculares de interação que levam a estabilidade dos complexos formados. A partir da técnica, é possível obter dados cinéticos, bem como constantes termodinâmicas de afinidade entre o nanocristais e a proteína de estudo (DE PAULA *et al.*, 2017; HU, Y. *et al.*, 2020).

Os analitos são injetados em um sistema de fluxo e encaminhados a pontos específicos na superfície do sensor, onde acontece a ligação em uma molécula alvo imobilizada (anticorpo, enzima, aptâmero, entre outros). O gráfico resultante fornece a informação das taxas de associação e dissociação à que o analito liga-se e é liberado da molécula alvo (LUZ, 2014).

O princípio da SPR está baseado em suas propriedades ópticas, em que é monitorado a variação do índice de reflexão causado pela interação da camada orgânica com a superfície metálica (NIKOLOVSKA-COLESKA, 2015). Desta maneira, consiste na oscilação de densidade de carga (elétrica ou eletrônica) ao longo da interface de dois meios (metal e material não-condutor). O metal a ser utilizado deve possuir propriedades de elétrons livres, sendo os mais utilizados o ouro e a prata. Dos sistemas desenvolvidos, o mais utilizado é o de Kretschmann, de configuração de refletância total atenuada (LUZ, 2014).

Figura 7 - Configuração de Kretschmann para SPR.



Fonte: Figura adaptada (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003).

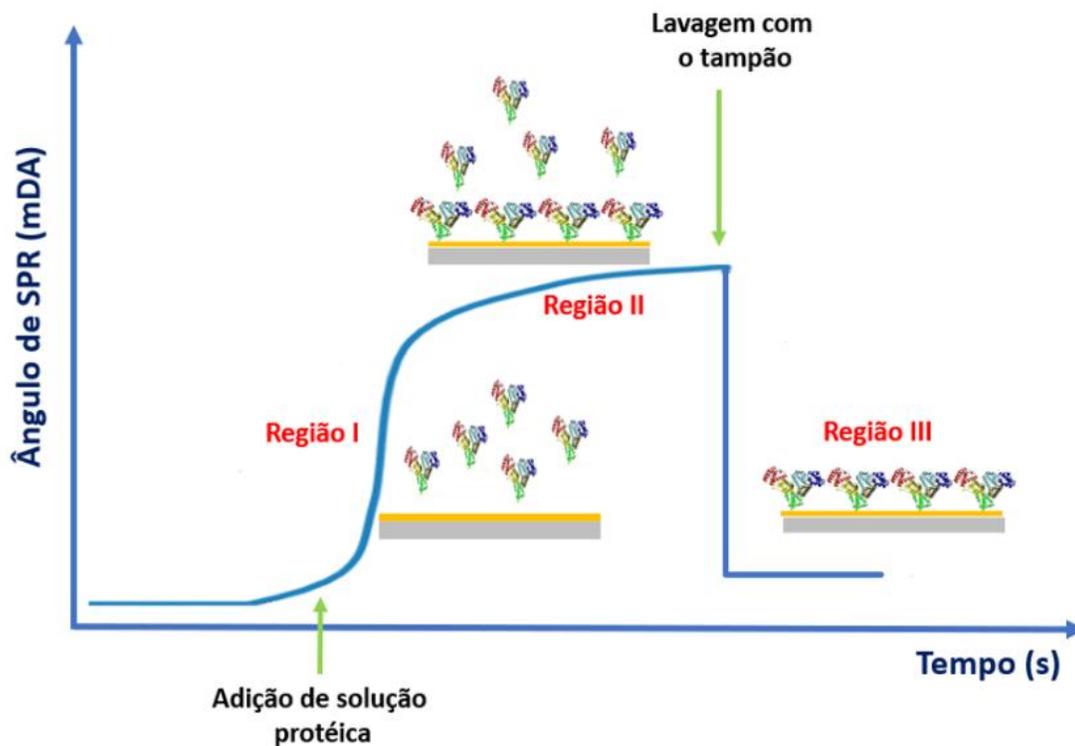
A configuração de Kretschmann está baseada no fenômeno de reflexão interna total, (Figura 7). Um feixe de luz polarizada incide em um ângulo de reflexão interna total em um meio óptico denso, como o vidro, e atinge uma interface entre este meio e um meio de densidade óptica menor, como o ar, sendo refletido de volta para o meio mais denso, permitindo assim que uma onda eletromagnética residual penetre na interface do meio menos denso, até a distância de um comprimento de onda (1λ) (LUZ, 2014). O ângulo de incidência da luz polarizada sofre alteração, devido a diferença dos meios de densidade óptica maior com o meio de densidade óptica menor (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003). Em determinado ângulo de incidência, quando o vetor de onda do plasma é igual ao vetor de onda do campo evanescente ($K_{sp} = K_x$), parte da radiação entra em ressonância com os elétrons livres, formando um plasma, no filme metálico, ocorrendo então a chamada ressonância plasmônica de superfície. Os plasmons são excitados no filme de ouro, e em consequência, causam uma diminuição da intensidade da radiação da onda eletromagnética que penetra a solução aquosa (LUZ, 2014). O aparelho mede a diminuição da intensidade da radiação, que é relacionada ao índice de refração da solução que está em contato com o filme de ouro. Esse valor depende da concentração da espécie química presente na solução próximo a interface do ouro (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003).

O índice de refração do meio sobre o filme metálico está diretamente relacionado ao K_{sp} (LUZ, 2014). Quando há uma variação, causada pela adsorção de uma camada proteica, por exemplo, o sistema busca um novo ângulo de incidência para que ocorra a excitação ressonante

do plasma de superfície (LUZ, 2014). Monitorando a alteração do ângulo de incidência com o tempo, é possível acompanhar como está ocorrendo a alteração na superfície do sensor. Diante disso, pode-se calcular a taxa com que ocorre o processo de ligação (on-rate) à superfície e também a taxa de desligar (off-rate) das interações e obter as constantes de associação e dissociação e as constantes de interação (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003; DE PAULA *et al.*, 2017).

A escolha do método de imobilização da proteína na superfície metálica é uma etapa sensível (REZENDE *et al.*, 2020). O método mais utilizado é o acoplamento amina, onde a superfície metálica (*sensorchip*) é preparada com uma solução-tampão para gerar uma linha base sob a curva do SPR. Após o processo de preparação do *chip*, uma solução da proteína a ser imobilizada é injetada no equipamento e entra em contato com a superfície do chip, ocorre uma ligação rápida no início da injeção, uma vez que o elemento de reconhecimento biológico interage com a alta concentração de moléculas da amostra disponíveis na superfície do sensor, que resulta em uma variação do ângulo de ressonância do SPR (Figura 8 - região I). A ligação de proteínas flutuantes e imobilizadas leva ao acúmulo de biomoléculas na superfície do sensor, resultando no aumento do índice de refração próximo à superfície. Alterações do índice de refração levam a alterações nas ondas do plasma da superfície (polaridade do plasma de superfície). Estas alterações são medidas em tempo real e assim fornecem informações sobre a eficiência de ligação das biomoléculas. À medida que o fluxo continua, a taxa de ligação observada diminui à medida que menos moléculas estão disponíveis na superfície (LUZ, 2014). Esse processo é seguido por um patamar no perfil de ligação, devido à saturação da superfície com a proteína (Figura 8 - região II). Após essa etapa de imobilização da proteína, injeta-se novamente solução tampão na célula de fluxo do equipamento para remover o material fracamente ligado, assim a superfície do sensor é regenerada de volta ao valor da linha base (região III) para a análise da próxima amostra, o processo está representado na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática do perfil de adsorção de proteína por SPR.

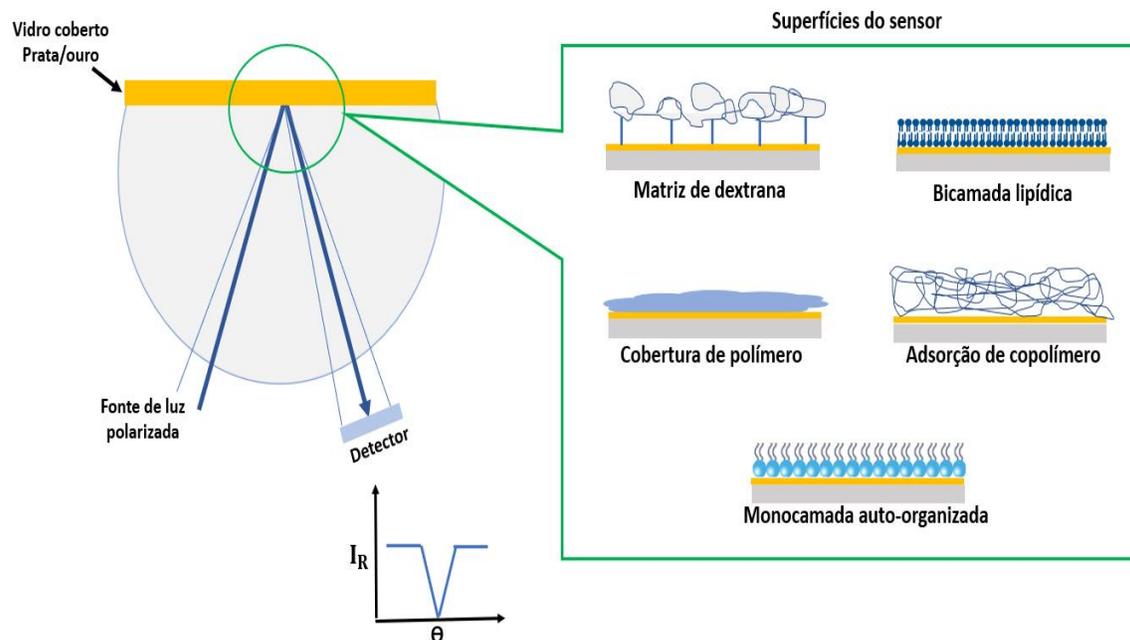


Fonte: Figura adaptada (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003).

Legenda: A cinética de adsorção é monitorada pela variação no valor do ângulo do SPR em função do tempo.

Além de proteínas, a superfície do filme de prata/ouro pode ser modificada originando-se uma variedade de superfícies sensoras. Os tipos de superfície que podem ser formadas estão representadas na Figura 9.

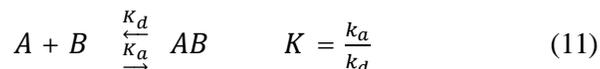
Figura 9 - Representação esquemática da superfície do filme de prata/ouro modificada com diferentes superfícies sensoras.



Fonte: Figura adaptada (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003).

Após processo de imobilização da proteína, o sensor chip contendo a proteína, ou a superfície sensora de interesse, está pronto para estudos interacionais envolvendo diferentes concentrações de PQs. Inicialmente é obtido uma linha base e é injetado no sistema de fluxo soluções do PQ de análise. A associação deve seguir uma etapa única exponencial e apresentar alguma curvatura antes da injeção do analito finalizar (XIAO, Q. *et al.*, 2009). A velocidade da formação depende da constante de taxa de associação, da concentração do PQ e do número de locais na proteína (XIAO, Q. *et al.*, 2009). A fase estável e o nivelamento da curva (horizontalização), indica que o número de eventos de associação é igual ao número de eventos de dissociação. Uma taxa de dissociação lenta exigirá um longo período de injeção para atingir o estado estacionário. Quando a dissociação é rápida, o estado estacionário é alcançado rapidamente após a injeção do analito (XIAO, Q. *et al.*, 2009). A dissociação depende apenas da constante de taxa de dissociação, mas em casos de forte interação, a curva pode ser quase horizontal. Quando há uma resposta residual após a dissociação, isso pode ser uma indicação de interação não específica com a proteína. É feita então uma injeção de tampão para dissociar o analito fracamente ligado sem interferir nas interações de interesse (COELHO *et al.*, 2022).

A variação causada no ângulo de ressonância inicial e o final fornece uma indicação sobre a extensão da ligação (GREEN *et al.*, 2000). Dessa forma, a técnica de SPR pode ser utilizada para análises quantitativas, análises cinéticas e cálculo de parâmetros termodinâmicos da interação da proteína (A) com PQs (B) através das equações 11, 12 e 13:



Onde K é a constante de equilíbrio do complexo AB, sendo k_a a constante de associação e k_d a constante de dissociação. A constante K_d é calculada a partir da equação 12, assumindo uma reação de 1° ordem:

$$\frac{dRU}{dt} = -k_d UR \quad (12)$$

Aqui, UR se refere a unidade de ressonância e a constante k_a é determinada a partir da inclinação do gráfico da constante de associação observada (k_{obs}) em função da concentração do [PQ] pela equação 13.

$$k_{obs} = k_a \cdot [PQ] + k_d \quad (13)$$

2.4 ESTUDOS INTERACIONAIS ENTRE NANOPARTÍCULAS COM ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES BIOLÓGICAS

Neste tópico será apresentado uma revisão bibliográfica detalhada das pesquisas ocorridas até então relacionadas à estudos de interações de nanopartículas com estruturas supramoleculares.

2.4.1 Interação de AuNPs com bicamada lipídica

Os processos de interação de NPs com modelos de membrana são diretamente afetados pelas características físico-química das nanopartículas (MOTEVALLIAN *et al.*, 2020). Sendo importante conhecer como ocorrem, se por endocitose mediada, pinocitose ou fagocitose, processos que também vão depender das características das NPs como tamanho, estabilidade, características de superfície, dentre outras (CANEPA *et al.*, 2021). Todos estes mecanismos de interação ainda não estão bem elucidados e por isso a necessidade de estudos que possam levantar metodologias para se estudar estes processos que envolvem aproximação, internalização e tráfego intracelular (VERMA; STELLACCI, 2010).

Com o aumento do interesse nos estudos envolvendo nanopartículas metálicas, em especial pelas potenciais aplicações nas áreas de saúde, a comunidade científica tem lançado esforços no entendimento dos mecanismos relacionados às interações NP-membrana, pois, para a maioria dessas aplicações, as nanopartículas têm de superar barreiras membranares por meio de endocitose e/ou penetração espontânea, para entrar no citosol (GAO, J. *et al.*, 2016).

De fato, embora vários estudos já tenham sido conduzidos no sentido de elucidar os mecanismos de interação entre nanopartículas com membranas, ainda existem muitas questões em aberto relacionadas diretamente às inovações terapêuticas, de diagnósticos e nanotoxicológicas do uso de nanopartículas (VERMA; STELLACCI, 2010). As AuNPs anfífilas aniônicas, por exemplo, já tiveram suas composições de superfície alteradas para explorar interações com quatro tipos diferentes de vesículas lipídicas. Pode-se observar, que grupos aromáticos ou volumosos na superfície tem um papel importante na interação de AuNPs aniônicas com bicamadas lipídicas (GAO, J. *et al.*, 2016). Concluindo que interações hidrofóbicas decorrentes da inserção de grupos aromáticos ou volumosos em bicamadas lipídicas são suficientemente fortes para resultar em perturbações evidentes nas vesículas lipídicas e nas membranas celulares (GAO, J. *et al.*, 2016). O entendimento obtido com o

estudo, fornece assim, uma nova visão sobre o mecanismo de ruptura da membrana causada pela interação hidrofóbica entre nanopartículas e bicamadas lipídicas.

Bicamadas lipídicas, formadas por vesículas unilamelares gigantes, também já foram colocadas em contato com AuNPs esféricas de 15 nm revestidas por uma camada de citrato ou passivadas por uma coroa de proteína (CARACCILO; FAROKHZAD; MAHMOUDI, 2017). Segundo os autores, o efeito da morfologia de nanoesferas de ouro, influenciam a permeabilidade e fluidez da bicamada apresentando diferenças, dependendo da escala de comprimento coloidal ou domínio molecular, a partir da qual a observação foi conduzida. A interação entre nanopartículas e membranas lipídicas devem ser convenientemente tratada como um fenômeno multi-escala (CARACCILO; FAROKHZAD; MAHMOUDI, 2017).

Já GRZELCZAK e colaboradores, demonstraram que nanopartículas de ouro de tamanhos diferentes (2, 15 e 38 nm) e hidrofobicidade controlável, obtidas a partir da complexação com o ligante 18-crown-6-CH₂-SH com íons de potássio, podem ser facilmente transferidas da dispersão aquosa para a orgânica. Dessa forma, podem ser empregadas com sucesso para se direcionar em membranas de vesículas (GRZELCZAK *et al.*, 2016). No qual as partículas não apenas se associam, como esperado, à membrana da vesícula hidrofóbica, mas também atuam como ionóforos (molécula solúvel em lipídios, usualmente sintetizada por microorganismos para transportar íons através da bicamada lipídica da membrana celular) altamente eficientes e seletivos para íons de potássio (GRZELCZAK *et al.*, 2016). Obtendo-se assim, nanopartículas de metal funcionalizadas como uma nova classe de transportadores de membrana com potenciais aplicações em pesquisa biomédica e de detecção (GRZELCZAK *et al.*, 2016; JOHANNSMIEIER *et al.*, 2018).

As AuNPs podem ser encapsuladas em bicamadas fosfolipídicas de forma a aprimorar a biocompatibilidade devido ao envolvimento da superfície das AuNPs com membranas semelhantes a células, fazendo com que tal complexo (AuNPs-bicamada) possa facilitar a captação celular, e possa ser usados em várias aplicações biológicas devido à captação celular melhorada, sem comprometer suas características (BANSAL *et al.*, 2020; GAO, Q. *et al.*, 2021; NAVYATHA; NARA, 2021). Estudos demonstraram que esses complexos podem aumentar a eficácia de teranósticos, que envolve a integração de nanociências que unem aplicações diagnósticas e terapêuticas para formar um único agente (denominado radiofármaco ou terapia radioligante). Este sistema permite o diagnóstico, a administração de medicamentos e o monitoramento da resposta ao tratamento simultaneamente (MARIN *et al.*, 2020). Entretanto, a agregação ou oligomerização de AuNPs nas membranas lipídicas ainda é um desafio para aplicação das NPs em sistemas biológicos (NAM *et al.*, 2016).

Baily e colaboradores, estudaram a interação de AuNPs de tamanhos diferentes (2, 5, 10 e 40 nm) com suporte de bicamada lipídica (SLB) de L- α -fosfatidilcolina, pelo tempo de 10 min de contato, usando microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação (QCM-D). As NPs foram testadas na ausência e na presença de ácido polimetacrílico (PMAA), utilizado para simular a matéria orgânica natural. Na ausência de PMAA, para todos os tamanhos de NP, observou-se apenas pequenas perdas de massa (1 a 6 ng) da membrana. A pequena remoção de lipídios pode ser um mecanismo de redução de energia livre para aliviar tensões induzidas pela adsorção de NPs, com mudanças muito pequenas para afetar a integridade da membrana. Na presença de PMAA, observaram um aumento de massa líquida no caso de NPs menores. Sugerindo que o aumento da adesão entre a NP e a bicamada, foi decorrente do PMAA que causou adsorção de NP na bicamada compensando qualquer perda de lipídio. A observação mais notável é a perda significativa de massa (60 ng) para AuNPs de 40 nm, que os autores atribuíram ao fato de a bicamada lipídica envolver a NP e ter deixado a superfície do cristal. Este estudo mostra que mesmo as NPs sendo intrinsecamente não citotóxicas, elas podem se tornar citotóxicas na presença de matéria orgânica (PMMA) que modula as interações entre a nanopartícula e a membrana (BAILEY *et al.*, 2015).

Para mais, a potencial toxicidade de AuNPs parece ser difícil de prever. Apesar do futuro promissor das AuNPs em vários campos biomédicos, ainda há uma série de questões fundamentais que precisam ser tratadas, incluindo questões relativas à especificidade da NPs, como tamanho, funcionalização e concentração (CANEPA *et al.*, 2021). Parâmetros importantes para se definir uma janela terapêutica dentro da qual as nanopartículas podem ser empregadas sem provocar quaisquer efeitos colaterais. Além do mais, nanopartículas devem ser rigorosamente purificadas, com controle de pureza estendido a cada reagente empregado na produção de AuNPs (FRATODDI *et al.*, 2015). Questões relevantes como o destino a longo prazo de AuNPs no organismo e os efeitos da exposição, ainda precisam ser minuciosamente investigados antes que AuNPs possam ser usados em humanos sem preocupações com os riscos para a saúde (BONDAR, 2019; FRATODDI *et al.*, 2015). Nesse sentido, é importante averiguar as diferenças entre toxicidade (citotoxicidade) e dano celular, que precisam ser mais esclarecidos. Nanopartículas que pareciam provocar pouca ou nenhuma citotoxicidade, conforme verificado usando ensaios padrões, podem causar danos celulares (FRATODDI *et al.*, 2015). Perdonet e colaboradores (2006), descobriram que AuNPs capeados com citrato com diâmetros de 13 nm são capazes de induzir a formação de filamentos de actina, resultando em uma diminuição na proliferação celular, adesão e motilidade. Sendo que estudos anteriores haviam observados que não provocariam a toxicidade em células (PERNODET *et al.*, 2006).

Isso decorre das investigações *in vitro*, não ser suficientemente representativo dos efeitos *in vivo*. Além de faltar ainda estudos interacionais físicos e químicos de questões básicas desses sistemas nanoparticulados com membranas (FRATODDI *et al.*, 2015). A falta de dados de princípios básicos envolvidos em processos interacionais, como parâmetros cinéticos e termodinâmicos, ainda impossibilitam uma avaliação de risco e do potencial perigo de NPs para uso biomédico (FRATODDI *et al.*, 2015). Torna-se claro, a necessidade de estudar aspectos interacionais de diferentes tamanhos de NPs em contato com modelos de membranas, afim de apontar indicadores iniciais que possam detectar possíveis efeitos adversos à saúde.

2.4.2 Interação de PQs de CdTe com proteínas

Os pontos quânticos (PQs) são nanomateriais semicondutores cristalinos de pequenas dimensões (1-10 nm), e que devido às suas propriedades eletrônicas e ópticas, têm demonstrado grande potencial para aplicações biológicas e médicas (JAMIESON *et al.*, 2007), como biossensores (SAPSFORD *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2006; STANISAVLJEVIC *et al.*, 2015), tecnologia genética (CHEN, A. A. *et al.*, 2005; GHAFARY *et al.*, 2017; ZHOU, J. *et al.*, 2016), marcação fluorescente de proteínas celulares (GIEPMANS *et al.*, 2005; HOWARTH *et al.*, 2005), detecção de patógenos e toxinas (BHARDWAJ *et al.*, 2018; GOLDMAN *et al.*, 2004; HAHN; KENG; KRAUSS, 2008; HAHN; TABB; KRAUSS, 2005; VIJIAN *et al.*, 2016) e entrega de drogas (IANNAZZO *et al.*, 2017; MATEA *et al.*, 2017; PROBST *et al.*, 2013; QI; GAO, 2008; ZRAZHEVSKIY; SENA; GAO, 2010). No entanto, alguns estudos *in vitro* mostraram que os PQs podem afetar o crescimento e a viabilidade das células (JAMIESON *et al.*, 2007), danificar a membrana celular que reveste os vasos sanguíneos e linfáticos e causar doenças vasculares (LOVRIC *et al.*, 2005; YAN, M. *et al.*, 2011). Essa citotoxicidade está altamente associada aos ligantes na superfície dos PQs, pois sua funcionalização pode alterar as propriedades físico-químicas, como tamanho, diâmetro hidrodinâmico e carga superficial (XIANG *et al.*, 2017; YAN, R. *et al.*, 2018). Portanto, para o uso seguro desses nanomateriais em aplicações médicas, é imprescindível entender suas interações com outras biomoléculas do corpo, bem como seus mecanismos de transporte.

Quando os PQs chegam à corrente sanguínea e são expostos a proteínas presentes no meio, suas superfícies podem ser revestidas com essas biomoléculas, formando complexos denominados proteína corona (CEDERVALL *et al.*, 2007). O plasma sanguíneo é composto essencialmente por várias proteínas, incluindo a albumina sérica humana (HSA), que é o principal componente proteico do sistema circulatório e tem função de transporte (LEE, P.;

WU, X., 2015; MACIĄŻEK-JURCZYK *et al.*, 2018). Portanto, a interação HSA-PQ é um fenômeno fundamental para a compreensão dos mecanismos de transporte desses nanomateriais em organismos e, conseqüentemente, é um fator chave para garantir a aplicação segura de PQs. Para compreender o mecanismo de formação da proteína corona, é fundamental determinar não apenas a termodinâmica, mas também os aspectos cinéticos dessa interação.

A formação da proteína corona pode ser afetada por vários fatores, como composição e funcionalização do PQ, bem como a natureza da proteína (MOTEEVALIAN *et al.*, 2020). Diferentes elementos semicondutores podem ser usados como precursores dessas nanopartículas. No entanto, os PQs de telureto de cádmio (CdTe) são os mais utilizados devido à sua boa biocompatibilidade, estabilidade química e alto rendimento quântico de fotoluminescência (HU, Y. *et al.*, 2020), o que torna estratégica sua interação com HSA. Os PQs de CdTe podem ser funcionalizados com várias moléculas, como cisteína (Cys), glutatona (GSH), N-acetilcisteína (NAC), ácido mercaptopropiônico (MPA) e ácido tioglicólico (TGA), que podem modular o mecanismo de interação com HSA (YAN, R. *et al.*, 2018). Dentre as moléculas comumente utilizadas, MPA e TGA se destacam por suas estruturas químicas muito semelhantes (a diferença de apenas um grupo metileno) (Figura 2), o que facilita a investigação de como pequenas mudanças na superfície PQ podem afetar a termodinâmica e cinética da formação de proteína corona.

Alguns estudos relataram o aspecto termodinâmico da interação entre PQs de CdTe capeados por MPA ou TGA com HSA e com a albumina de soro bovino (BSA). Em 2008, Liang, Chen e Han estudaram a interação entre BSA e PQs de CdTe capeados por TGA (2,6 nm), usando espectroscopia de fluorescência, ultravioleta-visível (UV-vis) e espectroscopia Raman. Os parâmetros termodinâmicos obtidos indicaram que o processo de complexação foi exotérmico e entropicamente favorável, o que foi atribuído às forças hidrofóbicas. Ademais, os resultados mostraram que o conteúdo α -helicoidal de BSA diminuiu após a interação com PQs (LIANG; CHENG; HAN, 2008). Em contraste, um estudo bioquímico e estrutural recente realizado por Motevalian *et al.* mostraram que a formação de proteínas corona entre HSA e PQs de CdTe funcionalizados com TGA não afetaram a estrutura da proteína (MOTEEVALIAN *et al.*, 2020). Todavia, um estudo termodinâmico completo da interação não foi realizado neste trabalho, o que deixa uma lacuna nas forças motrizes responsáveis pela formação desses complexos.

Por outro lado, a termodinâmica da interação entre PQs de CdTe funcionalizados por MPA e HSA foi estudada usando espectroscopia de fluorescência. Em 2010, Xiao e colaboradores, determinaram a influência do tamanho do PQ (2,04 e 3,79 nm) na interação com

HSA, revelando que a afinidade para a proteína aumenta com a dimensão do PQ (XIAO, J. *et al.*, 2010). Em 2012, Lai e colaboradores, determinaram as forças motrizes para a interação e descobriram que o processo era exotérmico e entropicamente favorável. Neste mesmo estudo, os resultados obtidos com a técnica de dicroísmo circular mostraram que os PQs podem induzir alterações conformacionais na proteína (LAI *et al.*, 2012). Já em 2013, Xiao e colaboradores, encontraram resultados semelhantes ao investigar o efeito do tamanho do PQ (2,0, 3,1, 3,7 e 4,8 nm) na termodinâmica da formação de complexos com HSA. Além disso, seu estudo mostrou que as principais mudanças conformacionais na estrutura da proteína ocorreram na interação com PQs relativamente grandes (4,8 nm) (XIAO, Q. *et al.*, 2013).

HU e colaboradores investigaram a cinética termodinâmica de interações entre proteínas do plasma, como fibrinogênio (FIB), plasminogênio (PLG), trombina (TM), metalotioneína II (MT-II) e albumina sérica humana (HSA) com pontos quânticos de HSA-CdTe@L-GSH/L-Cys, por técnicas de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e ressonância plasmônica de superfície (SPR) que se mostraram consistente e dependentes das propriedades das proteínas. Observaram que proteínas como FIB e PLG, relacionadas a processos de coagulação, tiveram mais afinidade pelo PQs. Esta interação foi atribuída principalmente às forças hidrofóbicas. Técnicas de espectroscopia de fluorescência e de espectroscopia de dicroísmo circular mostraram que as estruturas secundárias de ambas proteínas mudaram significativamente. No caso, a proteína FIB mostrou uma diminuição na estrutura da folha- β e um aumento no conteúdo de α -hélice. Já a proteína PLG, teve quase todas as suas curvas transformadas em estruturas de folhas. Este estudo é importante pois demonstra que os nanocristais podem interferir na conformação das proteínas e desencadear processos secundários (HU, Y. *et al.*, 2020). Assim, torna-se importante a investigação quantitativa e qualitativa completa da interação entre diferentes PQs com proteínas do plasma, para determinar o direcionamento dos nanocristais. Há várias técnicas e métodos que nos permitem estudar as interações intermoleculares entre proteínas e PQs. No presente trabalho, utilizamos a técnica de SPR que permitiu a obtenção dos parâmetros termodinâmicos como ΔG , ΔH e ΔS da interação entre PQs de CdTe@MPA e CdTe@TGA com a proteína HSA.

Quanto ao aspecto cinético da interação entre HSA e PQs de CdTe, até o momento, apenas um estudo relatou as constantes de taxa de associação (k_a) e dissociação (k_d) para a interação entre HSA e PQs de HSA-CdTe@L-GSH/L-Cys (HU, Y. *et al.*, 2020), enquanto a cinética de formação de complexos entre HSA e PQs funcionalizados com TGA ou MPA ainda é desconhecida.

3 OBJETIVOS

A seguir o objetivo geral do trabalho, bem como os objetivos específicos, serão apresentados.

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste trabalho foi avaliar interações entre diferentes nanopartículas com estruturas supramoleculares, produzidas artificialmente (membrana suportada) ou com a proteína de interesse (HSA), buscando caracterizá-las sobre o ponto de vista cinético e termodinâmico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar PQs de CdTe pelo método de síntese *one-pot* em meio aquoso e funcionalizá-los com diferentes passivadores de superfície, entre eles: TGA e MPA;
- b) Caracterizar os PQs funcionalizados em termos das suas propriedades ópticas e morfológicas, usando técnicas como: espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão (MET), UV-vis e fluorescência;
- c) Sintetizar nanopartículas de ouro funcionalizadas com citrato em diferentes tamanhos (4, 15, 40 e 60 nm);
- d) Caracterizar as nanopartículas de ouro de forma a determinar suas propriedades ópticas e morfológicas, através das técnicas de: espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta e UV-vis;
- e) Preparar Membrana suportada (s-BLM) sob eletrodo de platina;
- f) Avaliar a interação entre AuNPs com a membrana suportada por voltametria cíclica;
- g) Avaliar a citotoxicidade das AuNPs com células Calu-3 pelo ensaio MTT;
- h) Estudar a interação da proteína albumina do soro humano (HSA) com PQs, por meio da técnica de SPR e docking molecular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir são apresentados os materiais e métodos relacionados aos estudos realizados na presente tese. Para fins de organização, o trabalho foi dividido em dois estudos, a saber: (i) Avaliação entre AuNPs e membrana artificiais suportadas e (ii) Avaliação da interação de PQs com proteína. Os aspectos que são comuns aos dois estudos foram agrupados.

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Cloreto de cádmio (98%); Telurito de sódio (99%); Acetona (98%); Ácido tioglicólico (TGA, 98%); ácido mercaptopropiônico (MPA, 98%); Clorofórmio (99%); alumina; L- α -fosfatidilcolina de soja hidrogenada (99%); Colesterol; Cloreto de potássio (KCl, 99%); solução de cloreto áurico (III) (99%); Citrato trissódico (99%); ácido ascórbico (98%); brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, 98%); Fosfato de sódio dibásico (NaHPO_4 , 98%), e fosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 98%); brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT); solução salina (PBS); dimetilsulfóxido (DMSO); Calu-3: linhagem celular pulmonar humana foram adquiridos da Sigma Aldrich; água Milli-Q (Milipore); Borohidreto de sódio (98%) obtido da Nuclear; Hidróxido de sódio (97%) obtido pela Vetec; Hexacianoferrato de potássio (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 99%) obtidos pela Merck; Chips de sensor CM5 e reagentes de acoplamento (N-etil-N',N'dimetilaminopropilcarbodiimida, EDC; N-hidroxisuccinimida, NHS; e cloridrato de etanolamina 1 M, pH 8,5) foram adquiridos da GE Healthcare (Pittsburgh, PA, EUA); Eletrodo de referência de Ag/AgCl; eletrodo de platina (0,50 mm de diâmetro); eletrodo de ouro (2 mm de diâmetro).

Espectrofotômetro de fluorescência (Cary Eclipse); Espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UV-2401-PC, EUA); Microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução (JEOL JEM-2100 a 200 kV); Sonicador ultra-sônico (Unique®); Analisador de tamanho de partícula (Malvern Zetasizer Nanoseries/ NANO ZS90); Potencial zeta (Malvern Instrument Zetasizer Nano-ZS90); Ressonância plasmônica de superfície (Biacore X100 - GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA); Difrátômetro de raios-X (DRX-Rigaku Ultima IV); Espectrofotômetro de infra-vermelho (Nicoletti S50 FT-IR) acoplado a Pike Gladi ATR Technologies (Thermo Scientific, EUA); Potenciostato-galvanostato PG-39MCSV (Omnimtra Instrumentos Científicos Ltda, Nova Friburgo, RJ, Brasil); Leitor de placas ELISA a 540 nm (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom, Reino Unido).

4.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PONTOS QUÂNTICOS DE CdTe

Doravante, serão descritos a metodologia de síntese para nanopartículas de ouro capeadas com citrato, que foram preparadas por um método já bem descrito na literatura, que permite a obtenção de nanopartículas esféricas e estáveis. Já os PQs de CdTe foram obtidos por meio da síntese em meio aquoso, por um método amplamente relatado e que permite a mudança de ligantes de superfície, como descritos abaixo.

4.2.1 Síntese de nanopartículas de ouro

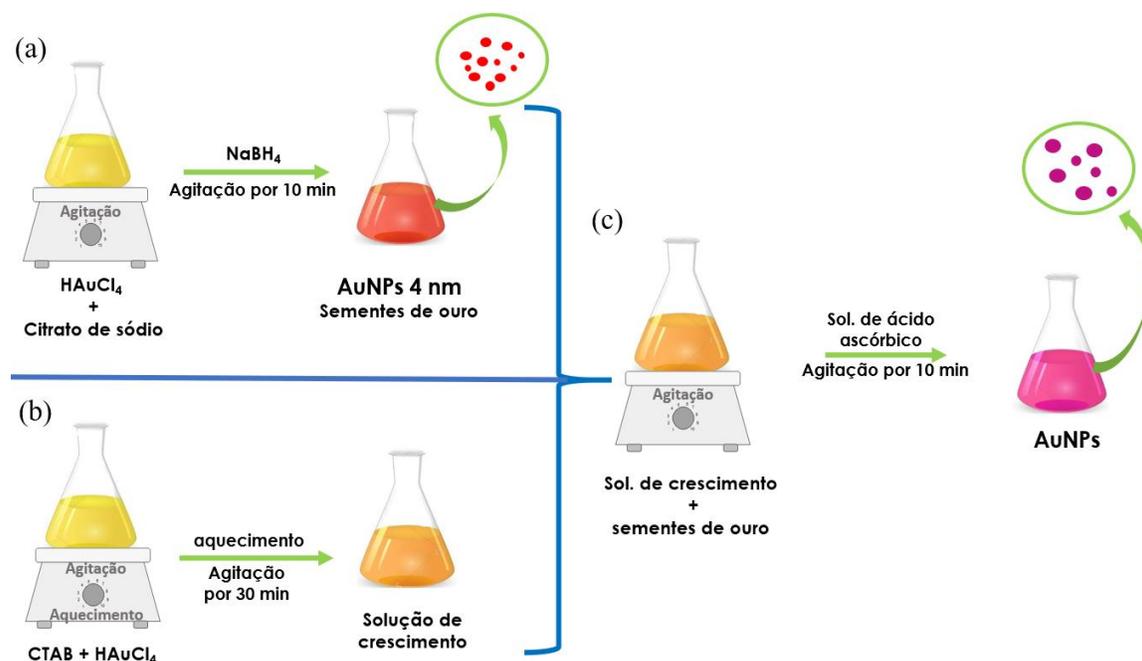
Antes do início dos experimentos, toda a vidraria utilizada foi devidamente lavada com a solução de água régia. As AuNPs de 4, 15, 40 e 60 nm foram obtidas pelo método denominado “crescimento de sementes” (JANA; GEARHEART; MURPHY, 2001).

Inicialmente, preparou-se 20 mL de solução aquosa de semente de AuNPs 4 nm, a partir de $2,5 \times 10^{-4}$ molL⁻¹ de H₂AuCl₄ e $2,5 \times 10^{-4}$ molL⁻¹ de citrato de sódio tribásico. Em seguida, adicionou-se à solução 0,6 mL de boridreto de sódio 0,1 molL⁻¹, enquanto se agitava vigorosamente em um agitador magnético (Figura 10 – (a)). A dispersão ficou amarronzada imediatamente após a adição de NaBH₄, indicando a formação de nanopartículas de 4 nm. As nanopartículas nesta dispersão foram usadas como sementes dentro de 4 horas após a preparação. A preparação da solução de crescimento (Figura 10 – (b)) foi realizada utilizando 40 mL de uma solução de $2,5 \times 10^{-4}$ molL⁻¹ de H₂AuCl₄, na qual foi adicionada sob intensa agitação em agitador magnético 1,2 g de brometo de cetiltrimetilamônio sólido (0,08 molL⁻¹ de concentração final), a mistura foi aquecida e agitada por mais 30 minutos até a solução ficar com uma coloração laranja clara. A solução foi deixada em repouso por 3 horas à temperatura ambiente para resfriamento e usada como solução de crescimento para obtenção de diferentes tamanhos de AuNPs.

Após este período, cinco conjuntos de erlenmeyer de 20 mL foram rotulados em A, B, C, D e E. O método de síntese foi semelhante ao observado na Figura 10- (c), onde primeiramente, no erlenmeyer A, sob agitação intensa e temperatura ambiente, foram adicionados 7,5 mL de solução de crescimento, seguido da adição de 0,05 mL de solução de ácido ascórbico 0,1 molL⁻¹. Por fim, se adiciona, 2,5 mL de dispersão de sementes, preparadas previamente. A agitação continuou durante 10 minutos e a solução ficou com uma cor avermelhada. As nanopartículas preparadas, possuíam um diâmetro em torno 8 nm e foram usadas como semente no erlenmeyer B, e assim sucessivamente até obter nanopartículas de

tamanho de 60 nm no Erlenmeyer E. As dispersões obtidas de 8 nm não foram utilizadas para estudos interacionais e foram descartadas. Já as dispersões obtidas em A (AuNPs de 4 nm), C (AuNPs de 15 nm), D (AuNPs de 40 nm) e E (AuNPs de 60 nm), foram estáveis por aproximadamente um mês e armazenadas em temperatura ambiente.

Figura 10 - Esquema de síntese de AuNPs pelo método de crescimento de sementes.



Fonte: Da autora.

Legenda: Sendo o esquema em (a) preparação de sementes de ouro de (AuNPs de 4 nm); (b) preparação de solução de crescimento e (c) esquema do método de síntese para obtenção de AuNPs de diferentes tamanhos.

4.2.2 Métodos de caracterização das nanopartículas de ouro

As caracterizações foram feitas por UV-vis e foram realizadas em um equipamento de espectrofotômetro UV-2550 da Shimadzu, que contém lâmpadas de tungstênio e deutério como fonte de radiação que utiliza duplo feixe realizando varreduras de 200 a 900 nm. Para as medidas de absorção foi utilizado o modo varredura e os espectros foram registrados entre os comprimentos de onda (λ) de 400 e 700 nm para as dispersões de AuNPs recém preparadas, afim de avaliar a presença de bandas características de ressonância plasmônica de superfície das AuNPs de diferentes tamanhos. As leituras foram realizadas em temperatura ambiente.

As análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS- Dynamic Light Scattering), para verificar o tamanho das AuNPs, também foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nano

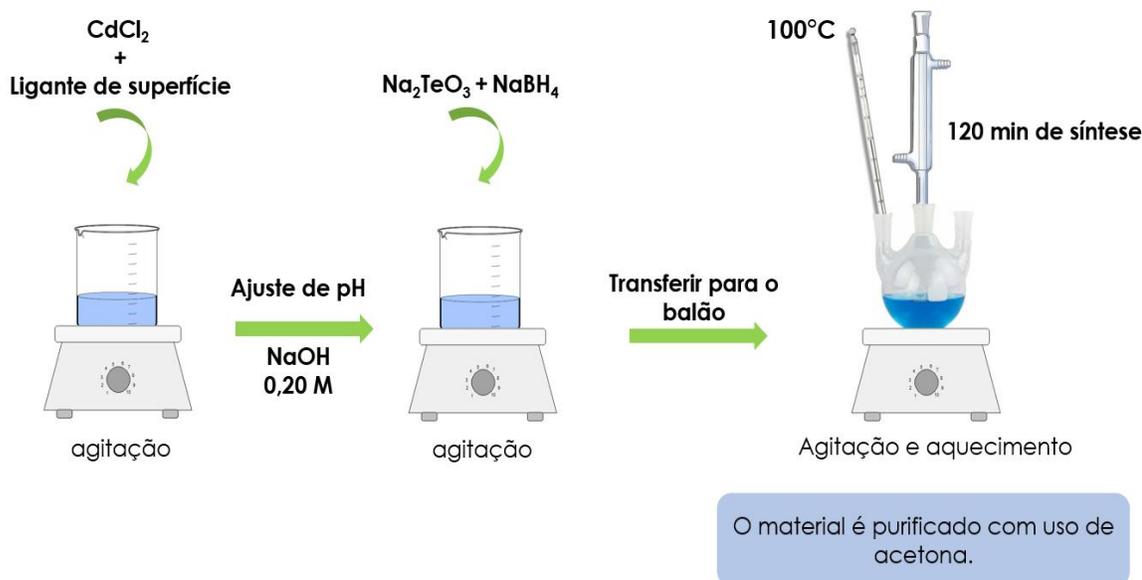
ZS, da Malvern, com laser He-Ne com comprimento de onda de 633 nm e potência de 4 mW, e as medidas foram coletadas com o auxílio do sistema NIBS, com ângulo de 173°. Para a análise utilizou-se uma diluição de AuNPs em água na proporção de 1:100. As medidas de potencial zeta foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS, da Malvern, com laser He-Ne 633 nm com potência de 4 mW.

4.2.3 Síntese dos nanocristais de CdTe

Os pontos quânticos de CdTe foram obtidos via método de síntese *one-pot* em meio aquoso, como esquematizado na Figura 11 (WANG; LIU, 2012). De forma geral, o procedimento envolveu a adição de 0,4 mmol de cloreto de cádmio (CdCl_2) juntamente com 0,8 mmol do ligante de superfície (TGA ou MPA) em um béquer contendo 80 mL de água milli-Q. Em seguida ajustou-se o pH para 10,0 com adição de NaOH 0,20 molL⁻¹ e então, adicionou-se o telurito de sódio (Na_2TeO_3), em proporção 1:20 entre Te: Cd, e por fim, 0,1 mmol de borohidreto de sódio (NaBH_4). A mistura foi vertida em um balão de três bocas de 120 mL, onde foi acoplado a um condensador de refluxo, um termômetro e a terceira via do balão foi vedada com septo. A evolução do processo foi acompanhada através de retiradas de alíquotas de aproximadamente 5 mL da mistura reacional a cada 30 min., em um total de 2 horas de síntese.

Após as sínteses de CdTe, em meio aquoso, foi realizada a etapa de purificação. A purificação ocorreu por precipitação seletiva, com a adição de um solvente miscível em água (acetona). Porém, que não dispersa os pontos quânticos, permitindo sua decantação. Desta forma, foi adicionado acetona na solução aquosa de CdTe, até que ocorresse o turvamento. Transferiu-se a solução para tubos tipo Falcon e centrifugou a 3000 rpm por 8 minutos, precipitando os PQs. O sobrenadante foi descartado e foi realizada a lavagem com solvente por mais duas vezes. Ao final, o material foi seco na estufa à 40 °C por 24 horas.

Figura 11 - Esquema de síntese de PQs de CdTe em meio aquoso.



Fonte: Da autora.

4.2.4 Métodos de caracterização dos pontos quânticos de CdTe

Após o processo de síntese e purificação dos pontos quânticos foi realizada as caracterizações do PQs obtidos. A caracterização óptica dos PQs sintetizados foi realizada usando espectroscopias UV-vis e de fluorescência. Os espectros de absorção na região UV-vis foram obtidos na faixa de 400-700 nm utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific™ Evolution 60S UV-vis. Espectros de fotoluminescência (PL) foram registrados na faixa de 400-700 nm usando um espectrômetro Cary Eclipse (Varian), utilizando um comprimento de onda de 355 nm para a excitação das amostras e a emissão da luminescência.

Em seguida, o rendimento quântico de luminescência (Φ_f) foi realizado conforme descrito na literatura por (VALE et al., 2015). Que consiste em realizar análise de absorção e de fotoluminescência de soluções de PQs em diferentes concentrações e comparar com diferentes concentrações do padrão, rodamina 6G ($\Phi_f = 95\%$) (DA ROSA et al., 2021). As medidas de UV-Vis foram realizadas em 355 nm, registrando a absorção neste comprimento de onda, e a luminescência entre 400 e 800 nm, sendo registrado a área sob a curva. Os dados foram plotados em um sistema cartesiano, onde o eixo da abscissa representava a absorção e o

eixo da ordenada a emissão em diferentes concentrações. Após a regressão linear de cada reta passando pelo ponto (0,0), foi realizada a relação entre o coeficiente angular entre o ponto quântico e o padrão, conforme a Equação 14 (DA ROSA *et al.*, 2021).

$$\varnothing f \left(\frac{A_{PQ}}{A_{\text{rodamina}}} \times 100 \right) \times 0,95 \quad (14)$$

O tamanho e o potencial de superfície dos PQs funcionalizados com MPA ou TGA foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em um instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS, com um laser He-Ne de 633 nm, com potência de 4 mW. As medidas de potencial zeta também foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS, da Malvern. A titulação foi realizada entre o pH 4,0 e 12,0, sendo realizadas três medidas de potencial de superfície em cada pH analisado.

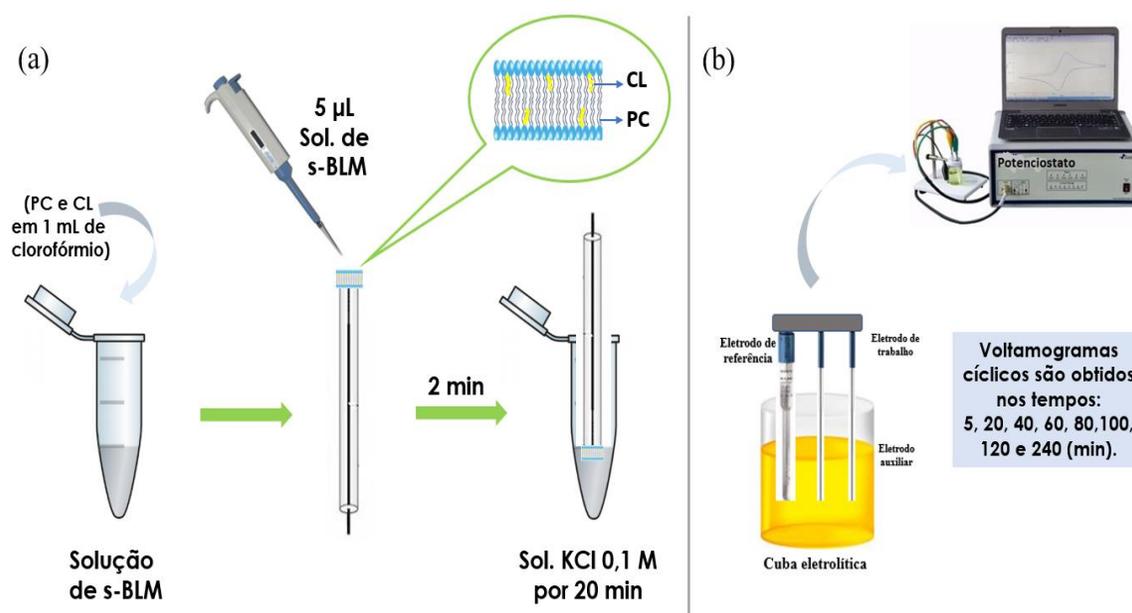
As imagens de microscopias de transmissão foram obtidas usando um microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução (HRTEM), coletadas em um instrumento JEOL JEM-2100 operado em 200 kV. As amostras de CdTe foram diluídas e adicionadas em um grid de cobre com malha de carbono (3-4 nm) (CUI *et al.*, 2012). As características cristalinas e a composição química dos PQs também foram avaliadas por difração de raios X em pó (DRX) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Os padrões de DRX foram registrados em um difratômetro de raios X Rigaku, modelo Última IV, empregando radiação $\text{CuK}, \alpha = 1,54051 \text{ \AA}$ na faixa de (2 θ): 10 – 80° com uma varredura de 0,01°. Os espectros de FT-IR foram registrados em um espectrômetro de infravermelho Nicolet S50 FTIR integrado com Pike Gladi A TR Technologies (Thermo Scientific, EUA). A amostra foi colocada diretamente sob o cristal (feixe de infravermelho), com resolução 4 cm^{-1} , 128 scan e limite entre 4000 e 500 cm^{-1} .

4.3 PREPARO DE BICAMADAS LIPÍDICAS SUPORTADAS (s-BLM)

Uma quantidade previamente medida de L- α -fosfatidilcolina (PC) e colesterol (CL) foram dissolvidos em clorofórmio, obtendo-se uma solução com concentração de 20 mg.mL^{-1} de PC e 7 mg.mL^{-1} de CL. Um eletrodo de platina (0,50 mm de diâmetro) foi previamente polido com alumina e sonificado em ultrassom por 20 minutos em béquer contendo água milli-Q. Em seguida, utilizou-se uma micropipeta, para gotear 5 μL da solução preparada, no eletrodo permanecendo assim por 2 minutos (também foram testados os tempos de 1, 3, 4, 5 e

6 min), necessário para suporte da membrana, ou seja, formação da membrana de bicamada lipídica (s-BLM) (OLIVEIRA, G.; SCHNEEDORF, 2021). Após o tempo de suporte, o eletrodo foi rapidamente transferido para uma solução de KCl 0,1 molL⁻¹, no qual ficou mergulhado por 20 minutos, afim de estabilizar a bicamada formada. Após o contato com a solução de KCl por 20 minutos (Figura 12 – (a), o eletrodo foi retirado da mesma e levado a cuba eletrolítica, que estava conectada ao potenciostato. Com isso, foram obtidos voltamogramas cíclicos nos tempos de 5, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 240 minutos, para verificar a estabilidade da membrana ao longo do tempo em contato com a solução de íons sonda de ferrocianeto (Fe(CN)₆^{4-/3-}) (Figura 12 – (b)).

Figura 12 - Método de preparação da s-BLM.



Fonte: Da autora.

A permeabilidade para íons de Fe(CN)₆^{4-/3-} foram avaliados por meio de varredura de potencial, na faixa de -0,2 a 0,6 mV a uma velocidade de varredura de 200 mV.s⁻¹ na presença de 1 mmolL⁻¹ de Fe(CN)₆^{3-/4-} em 0,1 molL⁻¹ de KCl como uma solução de suporte, onde o par redox de Fe(CN)₆^{4-/3-} foi utilizado para sondar as características das s-BLM (OLIVEIRA, G.; SCHNEEDORF, 2021). O sistema foi composto por três eletrodos, incluindo um eletrodo de Ag/AgCl (KCl saturada) como eletrodo referência, um eletrodo de ponta de ouro (2 mm de diâmetro), que serviu como um contra eletrodo, e o um eletrodo de platina como eletrodo de trabalho. Os experimentos foram conduzidos em um potenciostato-galvanostato PG-39MCSV (Omnimetra Instrumentos Científicos Ltda, Nova Friburgo, RJ, Brasil).

Após padronizar o tempo necessário para formação da s-BLM e verificar a estabilidade da mesma na solução de íons sonda, uma nova membrana foi suportada e foi conduzida uma padronização de rompimento da mesma através do uso de surfactante, para obter resultados característicos para se comparar com os resultados referentes às interações entre AuNPs com a s-BLM. Dessa forma, foi utilizada uma solução de surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) de concentração de 1%. Após o suporte da s-BLM no eletrodo (processo descrito na Figura 12 – (a)), o eletrodo contendo a membrana foi colocado em contato com a solução de SDS e deixado por 5 minutos, em seguida foi retirado e levado para a cuba eletrolítica e feito o registro do voltamograma, ao final, o eletrodo foi desconectado da cuba eletrolítica e mergulhado novamente na solução de SDS e deixado em contato por mais 20 minutos, e assim sucessivamente para todos os tempos de contato estudados (5, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 240 minutos). O mesmo procedimento foi realizado para investigar a interação da s-BLM com os diferentes tamanhos de AuNPs, após suporte da membrana o eletrodo foi imerso em dispersões de NPs nos tempos de já descritos e lidos no potenciostato.

Todos os estudos voltamétricos para averiguar o rompimento da s-BLM pelo surfactante e interação das AuNPs com a s-BLM, foram avaliadas por meio de varredura potencial na faixa de -0,2 a 0,6 mV a uma velocidade de varredura de 200 mV.s⁻¹ usando solução 1 m molL⁻¹ de Fe(CN)₆^{-4/-3} em 0,1 molL⁻¹ de KCl. Todas os experimentos foram conduzidos em triplicata e os dados são expressos como as médias.

4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para se avaliar os efeitos citotóxicos das AuNPs de 4, 15, 40 e 60 nm, foram realizados testes *in vitro* utilizando a linhagem celular Calu-3. As células foram semeadas em uma placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano a uma densidade de 1x10⁵ células/poço e deixadas em repouso para aderir na placa durante 24 horas a 37 °C numa incubadora umidificada com 5 % de CO₂. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por um meio fresco e então tratado com várias concentrações da nanopartícula e deixado durante 48 horas a 37 °C em atmosfera umidificada de 5 % de CO₂. Após esse período de incubação, o meio de cultura foi novamente substituído por um meio fresco (BAHUGUNA *et al.*, 2017).

Determinou-se o número de células viáveis pelo ensaio MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio]), onde avalia-se a viabilidade celular colorimetricamente pela técnica de espectroscopia, por meio da metabolização desse composto

pelas mitocôndrias, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, refletindo no estado funcional da cadeia respiratória (RISS *et al.*, 2004). Neste ensaio, a solução de trabalho MTT (5 mg mL^{-1} em PBS 50 m molL^{-1}) foi diluída na proporção de 1:10 em meio de cultura. A quantidade de $150 \mu\text{L}$ da solução resultante foi adicionada em cada poço da placa e incubado durante 4 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ na estufa umidificada de 5% de CO_2 . Em seguida, aspirou-se o meio e os cristais formados foram solubilizados por adição de $50 \mu\text{L}$ de DMSO por poço durante 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ na estufa umidificada de 5% de CO_2 . Finalmente, a intensidade da solução (cor púrpura) foi quantificada utilizando um leitor de placas ELISA a 540 nm (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom, Reino Unido) (GERLIER; THOMASSET, 1986).

Para todas as nanopartículas foram testados 5 pontos no gradiente: 1,1; 2,3; 5,7; 11,5; 23,0; 57,5; $115 \mu\text{M}$ (AuNP 4nm, AuNP 15nm, AuNP 40nm e AuNP 60nm).

4.5 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE

Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para as interações entre PQs e HSA foram obtidos pela técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), utilizando um instrumento Biacore X100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). Foram utilizados chips sensores CM5 compostos por dextrano carboximetilado covalentemente ligado a uma película de ouro. Na superfície do chip sensor havia dois canais de fluxo: o canal de amostra (no qual a proteína foi imobilizada) e o canal de referência. Durante a análise, a resposta do detector relaciona a dependência do sinal SPR (expresso em unidades de ressonância arbitrárias - UR) em relação ao tempo (t) em gráficos denominados sensorgramas, em que uma UR corresponde a uma alteração de $0,0001^\circ$ no ângulo SPR. O sinal de saída, ou resposta, do SPR é a diferença de sinais entre os canais de amostra (com HSA imobilizado) e de referência (sem HSA imobilizado) (COELHO *et al.*, 2019).

A HSA foi imobilizada na superfície do chip de acordo com um protocolo de acoplamento de amino. Primeiro, o chip CM5 foi ativado injetando uma mistura recém-preparada de EDC (0,4 M) e NHS (0,1 M) (1:1 v/v) a uma vazão de $10 \mu\text{L}/\text{min}$ por 7 min. A HSA, na concentração de $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão de imobilização (10 mM acetato de sódio a pH 4,0), foi injetado no canal de amostra e deixado reagir por 7 minutos a uma vazão de $10 \mu\text{L}/\text{min}$, resultando em densidades imobilizadas de HSA com média de 3893 RU (os valores de UR são proporcionais ao HSA realmente ligado). A densidade de imobilização aplicada no

presente estudo foi escolhida para evitar o efeito do transporte de massa (DE PAULA *et al.*, 2017).

Para experimentos de interação entre PQs-HSA as soluções foram preparadas em tampão a pH 7,4 a temperaturas que variaram de 284 à 298 K. Para obter os sensorgramas, soluções PQs em concentrações de trabalho de CdTe@MPA (16,3 – 64,9 nM) e CdTe@TGA (4,4 – 31,4 nM) foram preparadas em tampão de fluxo e foram escolhidas para obter uma relação linear entre a constante de taxa observada (k_{obs}) e a quantidade de PQs.

Os PQs foram injetados no chip imobilizado por HSA por 20 s a uma vazão de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Essa taxa de fluxo foi selecionada para evitar o efeito de massa, que ocorre quando a associação de um analito (PQs) ao ligante (proteína) é limitada pela difusão do analito na superfície do chip, ou seja, quando a taxa de difusão é mais lenta que a taxa de associação. As experiências foram realizadas em seis temperaturas (285,15; 289,15; 293,15; 298,15; 297,15; 301,15 K). O tampão de fluxo foi injetado duas vezes por 30 segundos a uma taxa de fluxo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ para regenerar a superfície do chip ao final de cada experimento. Em cada experimento de ligação, a solução PQ na concentração necessária foi injetada para aumentar a concentração de nanocristais nas superfícies de amostra (HSA imobilizada) e de referência (sem HSA), para minimizar ruído sistemático e desvio do instrumento. Todas as experiências foram realizadas em triplicata e os erros relativos estavam entre 1 e 3%.

4.6 ANÁLISE POR DOCKING MOLECULAR DA INTERAÇÃO DOS LIGANTES MPA E TGA COM A HSA

Para realizar docking molecular, a estrutura de proteína tridimensional da HSA (ID do PDB: 4La0) obtida por cristalografia de raios X com resolução de 2,40 Å (WANG, Z. *et al.*, 2013) foi recuperada do banco de dados de proteína RCSB (BURLEY *et al.*, 2021). A cadeia A do dímero de proteína estrutural foi selecionada e usada na análise de acoplamento molecular. A estrutura mol2 com as estruturas de MPA e TGA foi recuperado do banco de dados ZINC15 (STERLING; IRWIN, 2015) com números de adesão ZINC3860S82 e ZINC46S8S74, respectivamente. O encaixe molecular foi realizado pela AutoDock Vina versão 1.1.2 (TROTT; OLSON, 2009) implementado na plataforma PyRx (DALLAKYAN; OLSON, 2015). Primeiro, a proteína e ligantes foram preparadas utilizando autodocktools4 (MORRIS *et al.*, 2009) e o plugin Autogrid foi utilizado para definir as redes de encaixe. Um total de 9 modelos de interação foram produzidos para cada ligante e o melhor modelo com menor afinidade de ligação previsto foi selecionado e analisado na versão de Pymol 2.5 (<https://pymol.org/2/>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos nas análises de caracterização dos nanomateriais obtidos. Logo após, serão abordados os aspectos físico-químicos relacionados à interação dos diferentes nanomateriais sintetizados com os sistemas supramoleculares de interesse.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS

Os nanomateriais foram sintetizados no presente trabalho, de acordo com as metodologias descritas na seção 4.2, sendo amplamente caracterizados em termos das suas propriedades ópticas, através do uso de técnicas espectroscópicas, como UV-vis e Fluorescência, propriedades morfológicas e de superfície por meio das técnicas de DLS e MET, medindo-se o potencial zeta das diferentes NPs. A descrição detalhada das etapas de síntese e caracterização conduzidas para cada nanopartícula é apresentada a seguir.

5.1.1 Caracterização das AuNPs

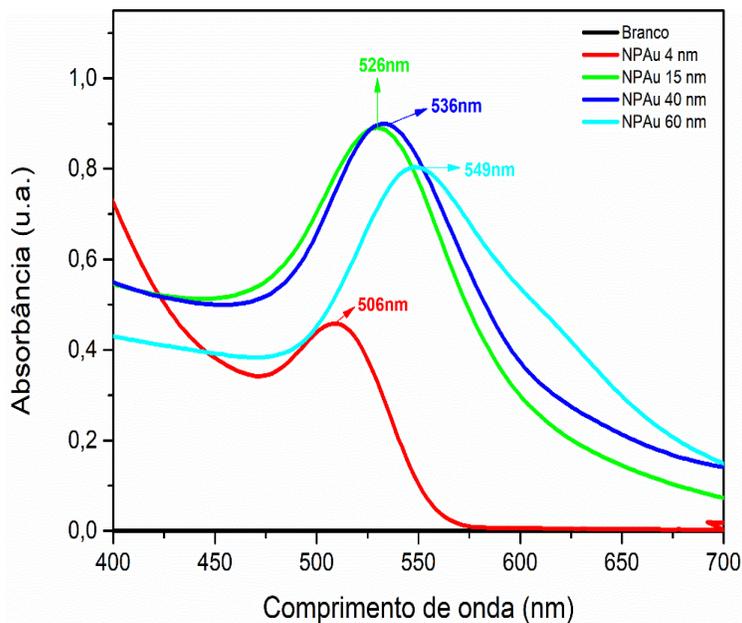
A síntese de AuNPs realizada no presente trabalho envolveu a formação de suspensão de ouro coloidal por meio da redução de Au^{3+} , em meio aquoso, para Au^0 pela ação do boridreto de sódio como agente redutor. O citrato de sódio foi utilizado na síntese como ligante de superfície, sendo responsável por aumentar a estabilidade coloidal evitando fenômenos de agregação e resultando na formação de nanopartículas esféricas. Aqui, o citrato serve apenas como agente de estabilização, uma vez que não consegue reduzir o sal de ouro à temperatura ambiente (25 °C). Além disso, para a obtenção de partículas maiores que 4 nm, foi empregado uma solução de crescimento em que o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um surfactante catiônico, atuou como direcionador do processo, o que favoreceu o aumento do tamanho das AuNPs (JANA; GEARHEART; MURPHY, 2001). Nesse caso, pequenas partículas de metal foram preparadas primeiro e depois utilizadas como sementes (centros de nucleação) para preparação de partículas maiores, esta é uma condição que inibe qualquer nucleação secundária, o tamanho de partícula pode ser controlado variando a proporção de semente para o sal de metal (JANA; GEARHEART; MURPHY, 2001). Os íons Au^{3+} foram introduzidos ao meio reacional a partir do ácido tetracloroáurico, que é a forma ácida do cloreto de ouro (III). E assim foi possível obter AuNPs de diferentes tamanhos.

As dispersões coloidais de AuNPs obtidas foram analisadas por espectroscopia de UV-Vis que nos fornece a primeira estimativa sobre três das principais características a respeito da síntese de nanopartículas: tamanho, dispersão e concentração (JANA; GEARHEART; MURPHY, 2001). As AuNPs possuem uma banda de absorção em torno de 520 nm, e de acordo com a forma e tamanho da banda é possível identificar agregação e/ou distribuição de tamanhos de partículas na amostra (IQBAL *et al.*, 2016). O decaimento acentuado após o máximo da banda é indicativo de uma amostra contendo nanopartículas com baixa polidispersão (SILVA, FERNANDA OLIVEIRA *et al.*, 2010). A Figura 13, apresenta os espectros UV-Vis obtidos após a síntese, no qual é possível inferir que as mesmas foram bem sucedidas.

Observa-se nesses espectros a presença de bandas características em 506, 526, 536 e 549 nm para os tamanhos de 4, 15, 40 e 60 nm respectivamente, além de apresentar decaimento acentuado, o qual indica característica de baixa polidispersão, se tratando de uma dispersão bem estabilizada pelo ligante de superfície (JANA; GEARHEART; MURPHY, 2001). Exceto para as NPs de 60 nm, que não decaem rapidamente a partir do máximo, indicando alta polidispersão da amostra. Por fim, através dos valores de absorvância nos respectivos comprimentos de onda e das relações com valores de absorvância da literatura (FU *et al.*, 2021; HAISS *et al.*, 2007; ZHANG, S. QI *et al.*, 2021), foi possível realizar os cálculos para determinar a concentração de AuNPs. Obtendo-se os valores de $6,72 \times 10^{-8}$, $3,7 \times 10^{-9}$, $2,69 \times 10^{-10}$, $6,11 \times 10^{-11} \text{ molL}^{-1}$, respectivamente.

Os raios hidrodinâmicos das AuNPs foram obtidos por DLS (espalhamento dinâmico de luz) que é uma técnica de dispersão de luz adequada para a determinação do diâmetro de partículas com dimensões na ordem nanométrica (ZHENG; BOTT; HUO, 2016). Esta técnica permitiu determinar distribuições de tamanhos das partículas e sua polispersidade (PDI) diretamente da solução coloidal de AuNP sintetizada. Os valores obtidos experimentalmente para os tamanhos das AuNPs são apresentados na Tabela 1. Os resultados indicaram que o diâmetro médio das nanopartículas é de aproximadamente 5,2; 22,3; 43,0; e 64,8 nm indicando o aumento do diâmetro das nanopartículas ao longo de cada etapa de síntese. O tamanho encontrado por DLS está dentro do esperado para os diferentes protocolos de sínteses realizados, se mostrando próximos dos valores esperados (4, 15, 40 e 60 nm) (JANA; GEARHEART; MURPHY, 2001).

Figura 13 - Espectro eletrônico de absorção da solução de nanopartículas de ouro de 4, 15, 40 e 60 nm.



Fonte: Da autora.

Para avaliar as propriedades de superfície das AuNPs sintetizadas, o potencial zeta de superfície para as diferentes suspensões das AuNPs foi determinado e os resultados são apresentados na Tabela 1. Os valores de potencial zeta observados experimentalmente para as diferentes suspensões foram superiores, em módulo, à 30 mV, sendo todos eles negativos. Isto implica em boa estabilidade coloidal eletrostática para essas suspensões coloidais pois, sabe-se que valores acima de 30 mV, sendo positivos ou negativos, sugerem suspensões de nanopartículas mais estáveis, uma vez que a repulsão eletrostática interpartícula previne que ocorra aglomeração com conseqüente fenômeno de coalescência e crescimento indesejado de partículas (BHATTACHARJEE, 2016; BRANDA *et al.*, 2015; RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020). Isso implicaria em alterações espectrais na região do UV-Vis ou mesmo alterações de cor da dispersão com o passar do tempo, que poderia até mesmo levar à precipitação das partículas à medida que o tamanho delas fossem aumentando (JANA; GEARHEART; MURPHY, 2001). Ao longo de todo o intervalo de tempo relacionado aos experimentos conduzidos, todas as suspensões se mostram bastante estáveis e nenhum desses fenômenos foi verificado.

Tabela 1 - Diâmetros médios e potencial de superfície das AuNPs obtidos por DLS e Potencial Zeta.

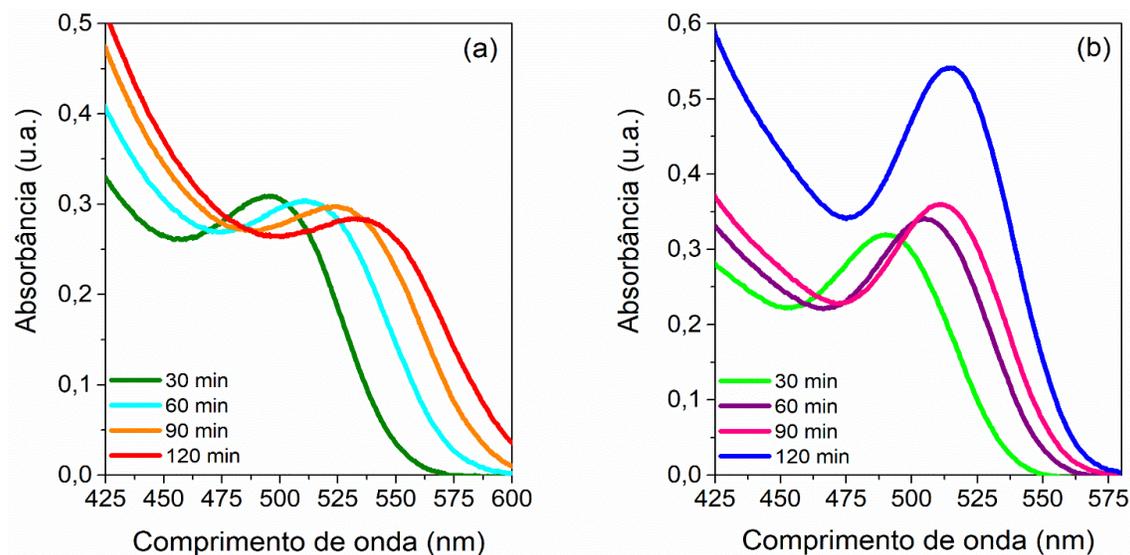
Nanopartículas	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (ζ /mV)
AuNPs	$5,2 \pm 2,3$	0,503	$-34,0 \pm 3,1$
AuNPs	$22,3 \pm 3,3$	0,409	$-31,7 \pm 3,8$
AuNPs	$43,0 \pm 4,2$	0,521	$-36,7 \pm 2,3$
AuNPs	$64,8 \pm 2,9$	0,456	$-34,7 \pm 1,5$

Fonte: Da autora.

5.1.2 Síntese e caracterização de pontos quânticos de CdTe

As alíquotas das sínteses dos PQs de CdTe, contendo diferentes ligantes de superfície como CdTe@MPA e CdTe@TGA, foram retiradas ao longo de 30, 60, 90 e 120 minutos, os respectivos espectros foram obtidos na região do UV-vis, como mostrado na Figura 14. Como pode ser observado, para ambos espectros, há o deslocamento acentuado das bandas de absorção para comprimentos de onda maiores, resultado do crescimento dos nanocristais no meio reacional com o avanço do tempo de síntese (VALE et al, 2015).

Figura 14 - Espectros de absorção no UV-vis dos pontos quânticos obtidos na síntese.

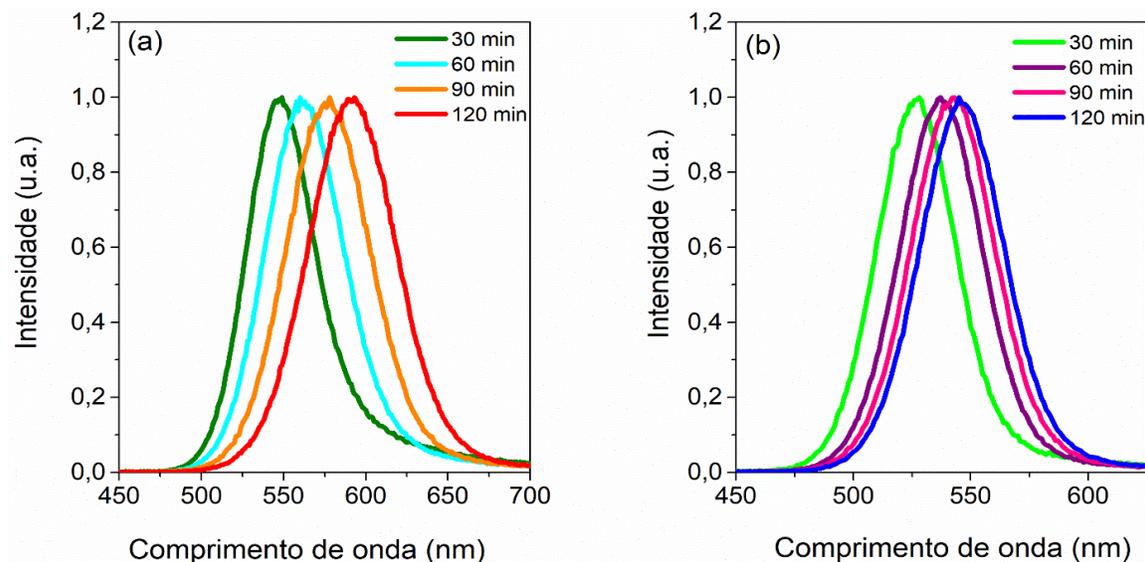


Fonte: Da autora.

Legenda: Espectros de UV-vis para (a) CdTe@MPA e (b) CdTe@TGA.

Os PQs de CdTe, funcionalizados com MPA ou TGA em diferentes tempos de síntese, também foram analisados por espectroscopia de fluorescência e os resultados são apresentados na Figura 15. Os dados obtidos mostram mudanças nas propriedades ópticas dos nanomateriais sintetizados, que eram dependentes do tempo de síntese (VALE; VIEIRA; SOUSA; FERRARI; *et al.*, 2015). Conforme mostrado na Tabela 2, a intensidade da luminescência variou significativamente com o tempo de síntese. Foi utilizado o comprimento de onda de 355 nm para realizar a excitação das amostras de CdTe@MPA e CdTe@TGA.

Figura 15 - Espectros de fotoluminescência dos pontos quânticos obtidos na síntese.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) CdTe@MPA e (b) CdTe@TGA. Foi utilizado o comprimento de onda de 355 nm para a excitação das amostras.

A Tabela 2 resume os dados obtidos diretamente da avaliação dos espectros apresentados nas Figuras 14 e 15, que foram usados para a caracterização óptica dos nanocristais preparados. Nestes espectros, os PQs formados em meio aquoso mostraram um pico de absorção excitônica bem resolvido, que foi desviado para o vermelho conforme o tempo de reação, e progrediu devido ao aumento no tamanho das partículas. O tamanho dos nanocristais obtidos em diferentes tempos de síntese para os diferentes PQs preparados foi estimado usando a equação (2) de Peng *et al.*, descrita na seção 2.1.2.

Além disso, com base nos dados de fluorescência mostrados na Figura 15, a evolução da emissão fluorescente pelos PQs pode ser avaliada com base no tempo de síntese. Os parâmetros de deslocamento de Stokes e largura de banda de meia altura foram avaliados com

base nos espectros mostrados nas Figuras 14 e 15 para quatro tempos de síntese diferentes. Esses parâmetros estão diretamente relacionados ao rendimento quântico da fotoluminescência (ϕ). Portanto, quanto menores os valores dos parâmetros citados, maior é a fotoluminescência (DA ROSA *et al.*, 2021). Do ponto de vista físico, os menores valores desses parâmetros indicam o surgimento de nanocristais no processo de síntese com menor ocorrência de defeitos superficiais, o que resulta em menos decaimentos não radioativos, que contribuem para perdas no rendimento quântico (VALE; VIEIRA; SOUSA; FERRARI; *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Principais dados obtidos a partir dos espectros de absorção e emissão.

Tempo de síntese (min)	λ_{max} absorção (nm)	λ_{max} emissão (nm)	Deslocamento de Stokes (nm)	Largura de meia altura	Diâmetro (nm)	Rendimento quântico (ϕ)
CdTe@MPA						
30	495.46	546.72	51.26	51.63	2.19	28.36
60	511.89	561.56	49.67	54.64	2.59	33.22
90	526.43	577.33	50.90	60.00	2.91	39.28
120	539.01	587.17	48.16	62.46	3.05	47.26
CdTe@TGA						
30	490.33	527.98	37.65	39.02	2.06	36.63
60	506.26	536.94	30.68	40.76	2.48	56.34
90	510.96	542.71	31.75	41.64	2.62	56.21
120	515.09	544.53	29.44	41.83	2.68	59.78

Fonte: Da autora.

Legenda: Diâmetro foi obtido pela equação de Peng.

Os dados espectroscópicos para os diferentes tempos de síntese mostram que o CdTe@TGA apresentou uma intensidade de banda maior do que aquele obtido para CdTe@MPA. O que reflete nos resultados obtidos para o ϕ (Tabela 2) desses PQs. Conforme demonstrado, o CdTe@TGA apresentou o maior rendimento em todos os tempos de reação avaliados, e para 120 min de síntese, ϕ foi de 59,78 %, ou seja, significativamente maior que 47,26% observado no mesmo tempo de síntese para o CdTe@MPA.

A Tabela 3 evidencia o diâmetro de partícula (d), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta ($P\zeta$) para as amostras de CdTe@MPA e CdTe@TGA obtidas via DLS. Ao utilizar a técnica DLS, o tamanho hidrodinâmico foi medido e caracterizado levando em consideração o movimento browniano das partículas (BRANDA *et al.*, 2015). O tamanho das partículas CdTe@MPA determinado por DLS variou de 2,33 a 3,33 nm. O mesmo comportamento foi observado para as partículas de CdTe@TGA, cujo tamanho variou de 2,17

a 2,98 nm. Isso indica que, para ambas as amostras, há um crescimento das partículas ao longo do tempo de síntese. Os valores de PDI indicam que os valores obtidos foram aceitáveis, porque valores altos podem indicar resultados irrealistas (BHATTACHARJEE, 2016).

Os valores de tamanho determinados por DLS (Tabela 3) foram semelhantes aos valores estimados usando a equação de Peng (Equação (2)) via UV-vis (Tabela 2). Essa proximidade, dos valores de tamanho, pode indicar que as dispersões contendo os PQs encontravam-se monodispersas, uma vez que sistemas polidispersos tendem a apresentar desvios maiores de tamanho entre uma técnica e outra (MOURDIKOU DIS; PALLARES; THANH, 2018; TEULON *et al.*, 2019). Porém, os valores obtidos via UV-vis foram apenas estimativas, uma vez que as medidas foram baseadas apenas na variação do pico de absorção máxima, o que não permitiu uma avaliação adequada da polidispersidade da amostra. Portanto, o UV-vis não deve ser usado para analisar quantitativamente o tamanho da nanopartícula (TOMASZEWSKA *et al.*, 2013).

As distribuições de tamanho dos PQs sintetizados (Figura 16 – (a)) foram medidas por DLS, obtendo-se valores médios de $3,33 \pm 0,06$ e $2,98 \pm 0,04$ nm para a síntese de CdTe@MPA e CdTe@TGA, respectivamente. Estes valores obtidos pela síntese aproximam-se dos estimados pela equação de Peng (Tabela 2).

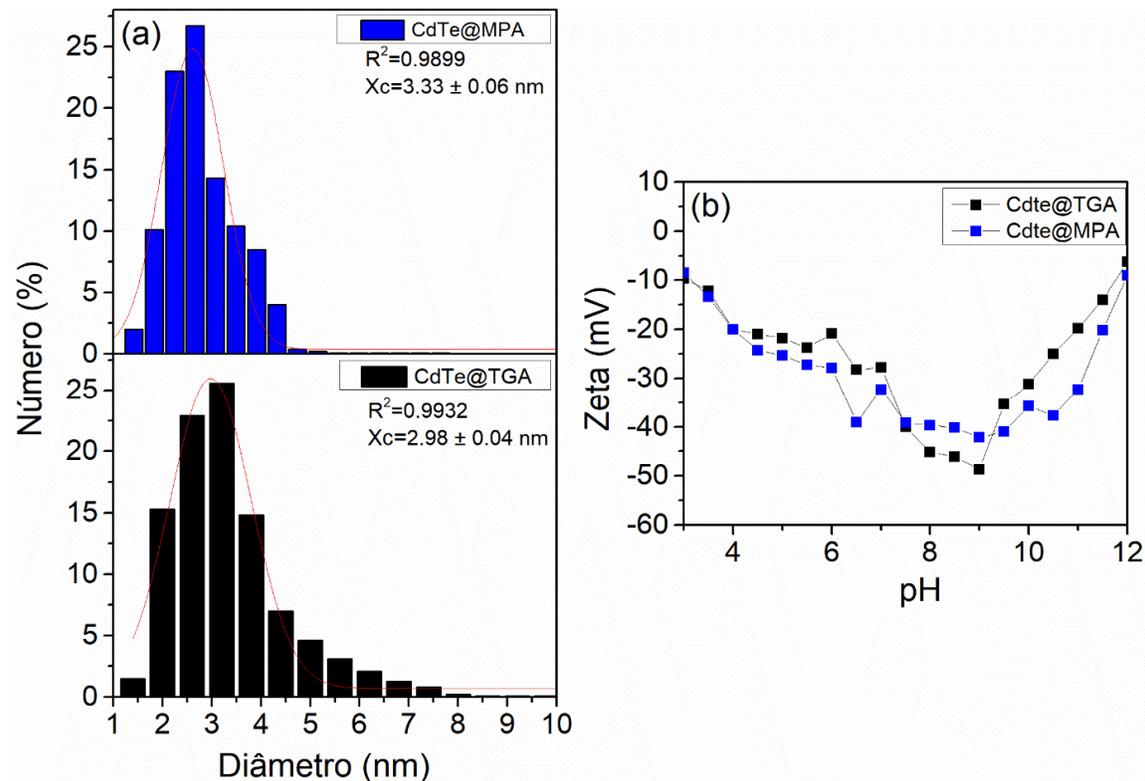
Por fim, conforme apresentado na Tabela 3, pode-se inferir que os PQs obtidos indicaram alta estabilidade eletrostática, com base nos valores dos potenciais zeta negativos verificados experimentalmente. Em geral, valores superiores a $|30 \text{ mV}|$ indicam que as forças repulsivas geradas por cargas superficiais são suficientes para prevenir a aglomeração de nanopartículas em solução (BHATTACHARJEE, 2016; BRANDA *et al.*, 2015; RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020).

O potencial zeta dos PQs foi medido em diferentes valores de pH, variando de 3 a 12 (Figura 16 – (b)). Ressalta-se que em $\text{pH} = 7,5$, os PQs de CdTe@MPA e CdTe@TGA apresentaram potenciais zeta de $|-39,2| \text{ mV}$ e $|-40| \text{ mV}$, respectivamente. Evidências de estabilidade eletrostática e desprotonação de hidroxilas em ambos os ligantes na superfície do material foram indicados.

A Figura 17 mostra micrografias representativas de MET para a síntese em meio aquoso, no tempo de 120 minutos para CdTe@TGA. Observa-se que as nanopartículas apresentam forma esférica e monodispersas. A distância planar ($3,79 \text{ \AA}$) extraída do padrão de difração de elétrons observada na imagem pode ser atribuída à direção (111), também de acordo com os dados de raios x do PQ de CdTe@TGA, cúbica de face centrada, conforme relatado a seguir

(PETROVIĆ; CHELLAPPAN; RAMAKRISHNA, 2015; WANG, JIE; ZHANG; DENG, 2017).

Figura 16 - Análise por DLS e potencial zeta para os pontos quânticos.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Distribuição de tamanhos obtida por DLS para os PQs de CdTe@MPA e CdTe@TGA obtidos em tempo de síntese de 120 min e (b) valores experimentais de potencial zeta de PQs de CdTe@MPA e CdTe@TGA, obtidos em tempo de síntese de 120 min em diferentes valores de pH.

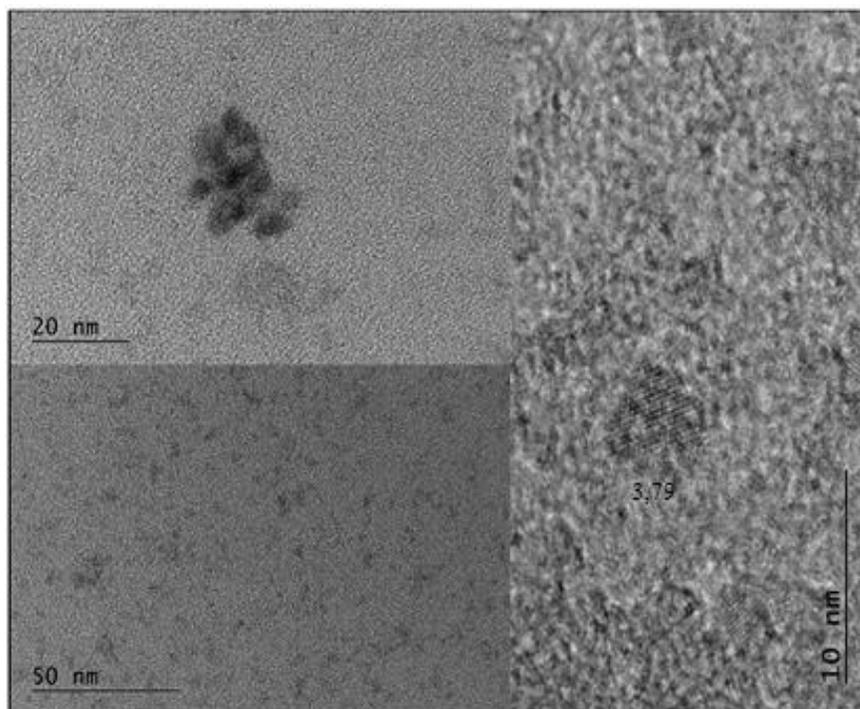
Tabela 3 - Análise de tamanho de partícula e potencial zeta (P ζ) para os PQs.

Amostra		d (nm)	PDI	P ζ (mV)
CdTe@MPA	30 min	2.33 \pm 0.03	0.328	-36.6 \pm 1.21
	60 min	2.47 \pm 0.16	0.343	-35.8 \pm 2.32
	90 min	2.89 \pm 0.07	0.421	-37.0 \pm 1.89
	120 min	3.33 \pm 0.06	0.454	-38.7 \pm 1.01
CdTe@TGA	30 min	2.17 \pm 0.12	0.345	-40.2 \pm 1.12
	60 min	2.65 \pm 0.07	0.521	-39.8 \pm 1.06
	90 min	2.70 \pm 0.03	0.397	-37.6 \pm 2.03
	120 min	2.98 \pm 0.04	0.386	-40.3 \pm 1.04

Fonte: Da autora.

Legenda: Tamanho de partícula (d), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (P ζ) para cada solução PQ obtida em diferentes tempos de síntese.

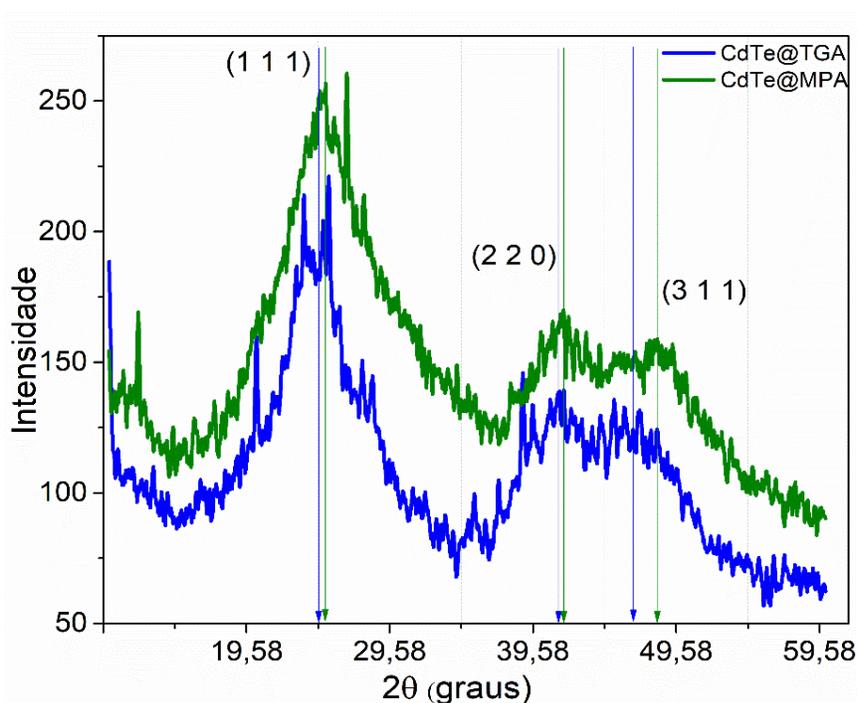
Figura 17 - Imagem de TEM obtida para nanopartículas de CdTe@TGA.



Fonte: Da autora.

A análise dos difratogramas de raios x obtidos para os PQs de CdTe@MPA e CdTe@TGA, sintetizados no tempo de 120 minutos (Figura 18) confirma a presença de estrutura cristalina para os PQs de CdTe para ambos os casos (TGA e MPA). Na Figura 18, os picos de difração para as amostras foram: CdTe@MPA ($2\theta = 25.1, 41.74$ e 48.28 graus) e CdTe@TGA ($2\theta = 24.58, 41.44$ e 46.7 graus). Esses valores são típicos de PQs e correspondem aos índices de Miller (111), (220) e (311), atribuídos a estrutura cúbica de blenda de zinco para o CdTe (JCPDS-75-0106). Os difratogramas não exibem nenhuma evidência de outras fases presentes.

Figura 18 - Difratogramas de raios x de PQs de CdTe.

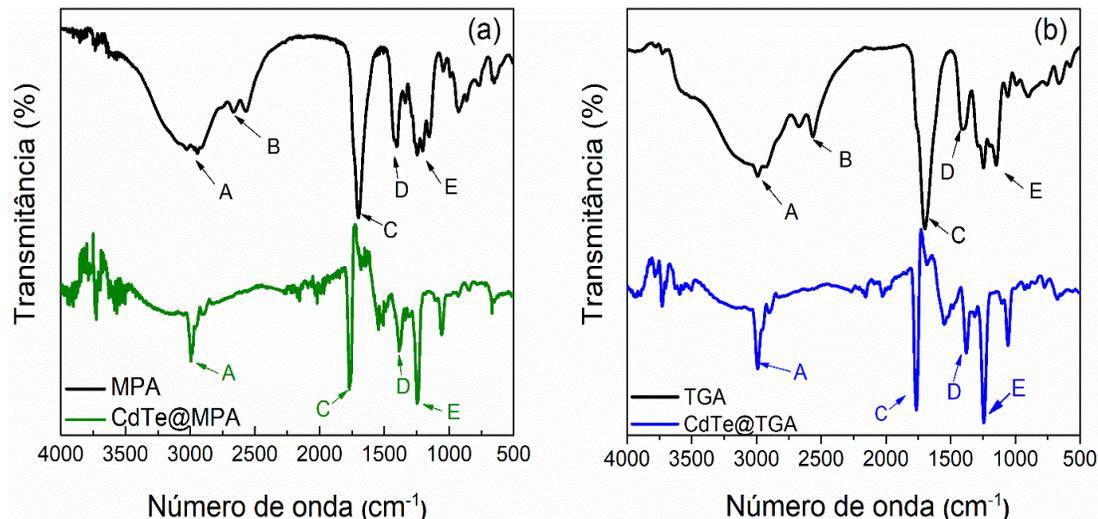


Fonte: Da autora.

Legenda: CdTe@ TGA (azul) e CdTe@MPA (verde) para tempo de síntese de 120 min.

A Figura 19 mostra os espectros de FT-IR obtidos para amostras de MPA e TGA, bem como para PQs sintetizados em solução aquosa com os respectivos ligantes (CdTe@TGA e CdTe@MPA). As vibrações típicas dos grupos moleculares estão listadas na Tabela 4.

Figura 19 - Espectros de FTIR de para os ligantes de TGA e MPA e dos PQs.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) CdTe@MPA e (b) CdTe@TGA, para tempo de síntese de 120 min.

Todas as bandas dos espectros mostrados na Tabela 4 foram consistentes com os resultados anteriores publicados na literatura (DA ROSA *et al.*, 2021; VALE; VIEIRA; SOUSA; FERRARI; *et al.*, 2015) e foram atribuídas principalmente aos grupos carbonil e alifático das moléculas de TGA e MPA. Nos espectros obtidos para os PQs sintetizados, foi observado que a banda extensível relacionada ao grupo tiol dos ligantes (banda SH fraca em 2600–2550 cm^{-1}) desapareceu devido à ligação do ligante à superfície do CdTe nanopartículas. Isso é indicativo da formação da ligação Cd-S, devido à forte afinidade dos íons metálicos para os íons tiolato (DA ROSA *et al.*, 2021).

Tabela 4 - Principais atribuições de bandas observadas no infravermelho para PQs de CdTe@TGA e CdTe@MPA.

Vibração	Número de onda (cm^{-1})	Símbolo
ν_{as} C-H	2997	A
ν S-H	2600 - 2550	B
ν C=O	1.760 - 1.710	C
ν_{as} C=O	1650-1550	D
ν CH ₂	~1420	E

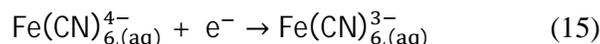
Fonte: Da autora.

5.2 ESTUDO INTERACIONAL ENTRE OS NANOMATERIAIS COM AS ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES

Nesta seção são apresentados os resultados decorrentes da interação das NPs sintetizadas com os sistemas supramoleculares de interesse do trabalho. Para tal, a seção foi dividida em duas partes: (i) Estudos envolvendo membrana suportada em eletrodo de platina com AuNPs e (ii) estudos interacionais de PQs com a proteína HSA.

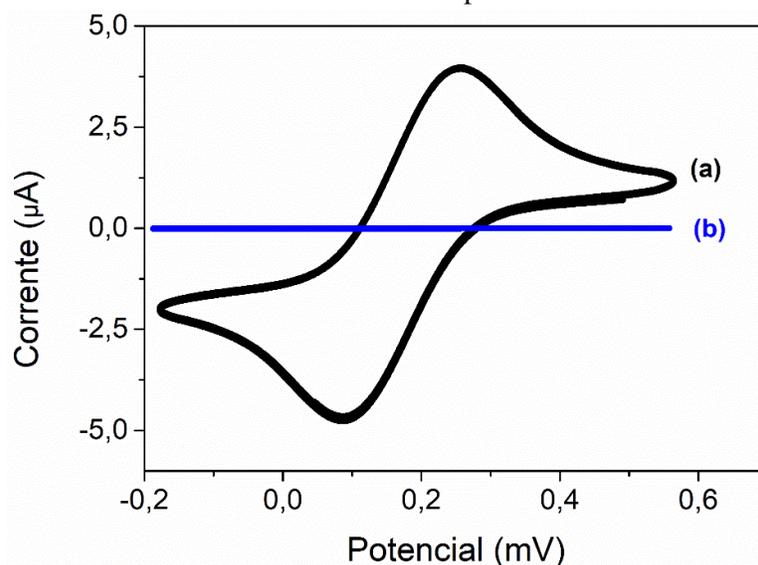
5.2.1 Estudo interacional de AuNPs com membrana suportada

A interação entre as diferentes AuNPs sintetizadas com uma membrana artificial suportada no eletrodo de platina, foi conduzida por meio do uso da técnica de voltametria cíclica. Na Figura 20 – (a), observa-se o voltamograma cíclico referente ao eletrodo nu, que não contém a membrana (s-BLM). É possível identificar que os íons marcadores proporcionaram como resposta um voltamograma cíclico onde aparece resposta de corrente faradaica (regida pela lei de Faraday), decorrente do processo de oxidação dos íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, na voltametria cíclica direta e da redução dos íons de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ na etapa inversa como apresentado na reação Equação 15 (BARBOSA *et al.*, 2011):



Entretanto, se observamos os voltamogramas cíclicos referente aos eletrodos contendo a s-BLM (Figura 20 – (b), observamos que as espécies utilizadas como íons-sondas ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) são impedidas de transferirem elétrons diretamente por meio de reação de oxidação/redução na interface eletrodo/solução (BARBOSA *et al.*, 2011). Nesse caso, a única resposta de corrente é a corrente capacitiva, já que não houve processos faradaicos de oxidação/redução (SCHOLZ, 2015). Uma formação perfeita da s-BLM é uma barreira altamente eficaz para a troca de carga entre a solução eletrolítica e a superfície do eletrodo (BARBOSA *et al.*, 2014). Assim, uma membrana sem defeito deve ser ionicamente impermeável, inibindo a aparência das correntes de pico redox (BARBOSA *et al.*, 2014). Desse modo, a formação da bicamada lipídica é considerada eficiente quando as correntes de picos anódica/catódica geradas pelos íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ forem suprimidas consideravelmente (WANG *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2016).

Figura 20 - Voltamograma cíclico da transferência de carga de íons de ferrocianeto na superfície do eletrodo.



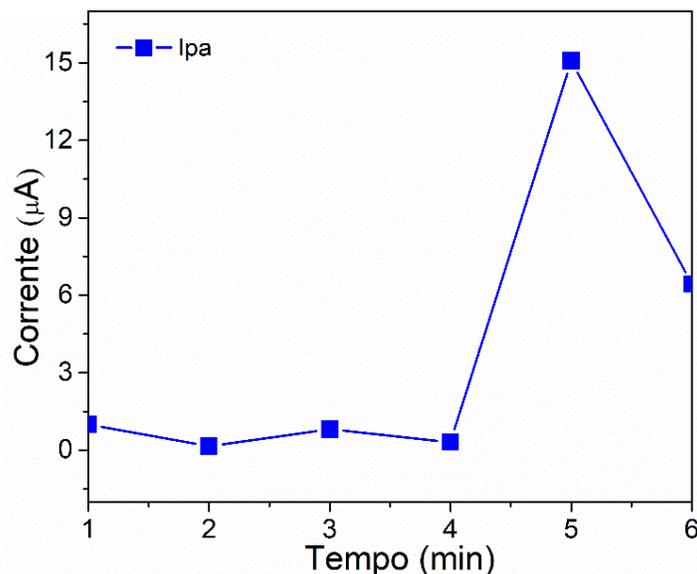
Fonte: Da autora.

Legenda: (a) eletrodo de Pt limpo; (b) eletrodo de Pt com a s-BLM em solução de ferrocianeto.

5.2.1.1 Caracterização da s-BLM na superfície do eletrodo por voltametria cíclica

Inicialmente, o estudo do processo de formação da membrana foi conduzido, determinando o tempo necessário para formação da mesma sobre a superfície do eletrodo, a partir do contato inicial do eletrodo com a solução de s-BLM. Dessa forma, obteve-se os voltamogramas para os diferentes tempos de contato eletrodo/solução de membrana e os resultados podem ser observados na figura do Apêndice A. A partir das correntes de pico anódicas (I_{pa}), lidas após 40 minutos do tempo inicial de suporte, obteve-se o gráfico presente na Figura 21. Em que podemos observar que a corrente referente ao tempo de suporte de 2 minutos apresenta menor valor de corrente de anódica. Uma vez que, nesse tempo específico, não deve ocorrer processos de transferência de massa entre a solução e a superfície do eletrodo. Para os outros tempos de suporte, processos de convecção (processo mecânico), que ocorrem devido a movimentação da solução (agitação magnética) são descartados, uma vez que a solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ foi mantida em repouso. Sendo assim, apenas processos de migração podem ter ocorrido. Além do mais, deve-se levar em consideração os processos de difusionais (BARBOSA *et al.*, 2014).

Figura 21 - Gráfico de formação da s-BLM em função do pico de corrente anódica.

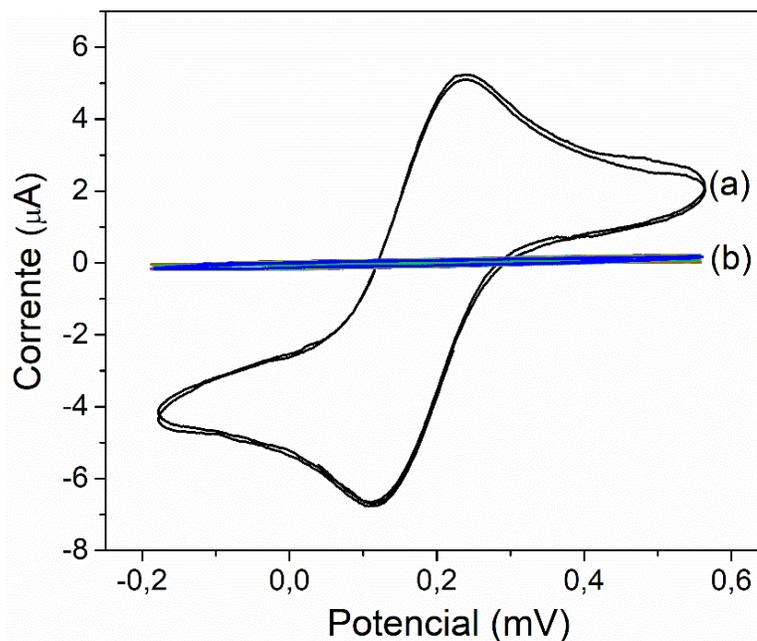


Fonte: Da autora.

Para estudo da formação e estabilidade da membrana, verificou-se que a solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, mesmo no tempo de 240 minutos, não influencia no sinal de corrente, que poderia ocorrer caso a membrana sofresse ação desta solução (Figura 22). O que nos permite inferir que a membrana permanece estável nesta solução, mesmo em contato direto por longos períodos. Fato já bem estudado e estabelecido na literatura (ELGRISHI *et al.*, 2018; GONZALEZ-ARAVENA *et al.*, 2018; KRISHNAVENI; GANESH, 2021).

Pela Figura presente no Apêndice 1 - (b), verificou-se que o tempo de 2 minutos após gotejar a solução da membrana no eletrodo é suficiente para formação da s-BLM, não necessitando de um tempo superior a este para suportá-la. Pode-se notar que a mesma permanece estável, um comportamento semelhante pode ser observado para a membrana de 3 minutos (Apêndice A- (c)). Entretanto, à partir de 4 minutos, verifica-se que a membrana vai perdendo integridade com o decorrer do tempo na presença de solução de íons sonda de ferrocianeto. Membranas suportadas usando o tempo de 5 e 6 minutos, também perderam a integridade com o decorrer do tempo, sendo possível observar picos de oxidação e redução.

Figura 22 - Dados eletroquímicos para a ação de ferrocianeto na estrutura da s-BLM formada no tempo de 2 min.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Sinal da voltametria cíclica de transferência de carga de íons ferrocianeto na superfície do eletrodo, no eletrodo de Pt limpo e (b) Sinal dos tempos de leitura de 5 à 240 minutos em solução de ferrocianeto.

A espessura “d” da membrana lipídica suportada sobre o eletrodo foi estimada a partir do valor de capacitância da membrana e da constante dielétrica (ϵ) da mesma, por meio da equação 16 (BARBOSA *et al.*, 2014):

$$C_{s-BLM} = \frac{\epsilon_0 \epsilon}{d} \quad (16)$$

No qual, ϵ_0 corresponde a permissividade no vácuo ($8,85 \times 10^{-14} \text{ F cm}^{-1}$), ϵ é a constante dielétrica da membrana s-BLM ($8,85418782 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2\text{N}^{-1}\text{m}^{-2}$) e C_{s-BLM} a capacitância da membrana.

Para bicamadas lipídicas formadas por fosfatidilcolina é esperado um valor de diâmetro próximo a faixa de 4 - 6 nm (BARBOSA *et al.*, 2014; DE BARROS *et al.*, 2019; LI; ZHAO; SUN, 2018). Para cálculo da capacitância da membrana (C_{s-BLM}) extrapolamos dois valores de I_a e I_c correspondentes ao potencial de oxidação anódico e redução catódica da curva (Equação 17) (BARBOSA *et al.*, 2014).

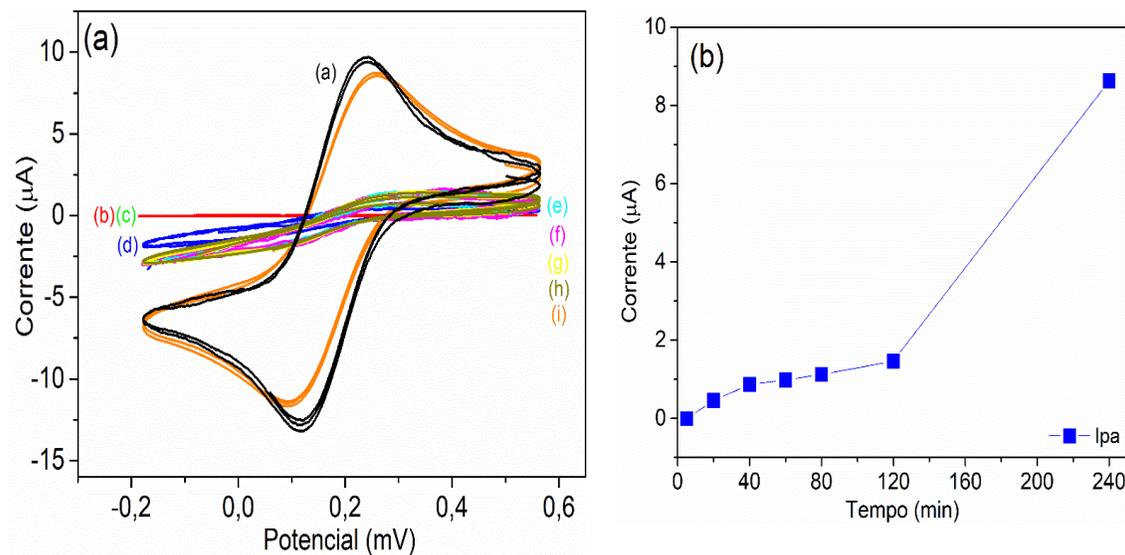
$$\frac{I_a - I_c}{2} = C_{s-BLM} \cdot \frac{dE}{dt} \quad (17)$$

O valor estimado da espessura da membrana foi igual a 7,14 nm, próximo da faixa de 4 - 6 nm encontrado na literatura para uma membrana de bicamada lipídica (BARBOSA *et al.*, 2014; VALLENS, 2019).

Para verificar a possibilidade de rompimento da membrana, foi criada uma metodologia de rompimento da s-BLM por dodecilsulfato de sódio (SDS), que é um tensoativo aniônico (carga negativa). O SDS tem sido utilizado para promover a lise de células, desnaturar proteínas e inibir atividade enzimática (JAFARI *et al.*, 2018). Por possuir uma cadeia alquílica, praticamente insolúvel em água, ligada covalente em sulfato de sódio (grupo iônico), este composto é capaz de interagir com os principais componentes de membranas, desestruturando e enfraquecendo a mesma (JAFARI *et al.*, 2018; OTZEN, 2017). Dessa forma, uma solução de 1% de SDS foi colocada em contato com a s-BLM, em diferentes tempos de contato.

Na Figura 23 – (a), observa-se que as correntes de picos anódica/catódica geradas pelos íons $Fe(CN)_6^{4-}$ e $Fe(CN)_6^{3-}$ retornaram à seus picos característicos, à medida em que o tempo de interação entre a solução de surfactante e a s-BLM aumenta. Uma análise específica de corrente anódica em função do tempo (Figura 23 – (b)), deixa mais evidenciado que o efeito do surfactante é mais realçado após 80 min. de contato, ficando claro o transporte de íons para o eletrodo de Pt. Isso significa que o SDS pode ser usado para romper/desestabilizar a membrana suportada no eletrodo. Com 20 minutos de contato, já é possível observar retorno sutil dos picos de corrente anódica/catódica, confirmando a ação de rompimento da s-BLM por solução de SDS 1%. Os surfactantes podem aumentar a rompimento/permeabilidade da membrana por uma variedade de mecanismos, como deformação de curvatura de bicamada, causada por inserção assimétrica do surfactante, que podem levar à falha mecânica da membrana (HEERKLOTZ, 2008). Sendo esta uma possível explicação para observação de sinal eletroquímico após contato com o SDS.

Figura 23 - Voltamogramas cíclicos para rompimento da s-BLM após contato com solução de SDS 1% variando-se o tempo de varredura.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) eletrodo de Pt limpo; (b) s-BLM; (c) 5; (d) 20; (e) 40; (f) 60; (g) 80; (h) 120 e (i) 240 min.

Sistemas supramoleculares para investigar interações de nanopartículas têm sido amplamente utilizados (BAILEY *et al.*, 2015; BHAT *et al.*, 2016; CANEPA *et al.*, 2021; VAN LEHN *et al.*, 2013). Isto ocorre devido o sucesso terapêutico de sistemas nanoparticulados para marcação celular e entrega de medicamentos (CANEPA *et al.*, 2021). Entretanto, o sucesso dessa abordagem depende da capacidade das NPs interagir favoravelmente com o ambiente biológico, além de específico reconhecimento do alvo de estudo (FRATODDI *et al.*, 2015). Entretanto, ainda hoje, pouco se sabe sobre os processos de interação com a membrana. Por isso buscamos usar membranas artificiais, para tentar entender como o contato de AuNPs podem afetar a organização coordenada de camada lipídicas suportadas em eletrodo de platina. Sabe-se que que o sistema interface nano-biológico representa o principal facilitador de troca de comunicação celular, onde as propriedades de superfície das nanopartículas como ligante de superfície e tamanho governam processos de reconhecimento e distribuição (BONDAR, 2019).

5.2.1.2 Estudo do efeito do tamanho de AuNPs na interação com a membrana suportada por voltametria cíclica

Para investigar os processos de permeação de íons através da s-BLM, o eletrodo de Pt, revestido com s-BLM, foi inserido em dispersões de AuNPs de diferentes tamanhos pelo tempo

de 5, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 240 minutos, em seguida, após cada tempo de incubação, transferimos o eletrodo para uma solução de KCl 0,1 mol/L contendo 1,0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]/[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ (1:1) na célula eletrolítica. A resposta da VC referente ao eletrodo de Pt foi registrada em cada um dos tempos após contato com a dispersão de NP.

O efeito de AuNPs sobre membranas têm sido descritos por alguns autores (CONTINI *et al.*, 2020; HEINZ *et al.*, 2017; SCHNEEMILCH; QUIRKE, 2021; VALES *et al.*, 2020), a fim de determinar um diâmetro crítico para interação com modelos de membrana. Contini e colaboradores ressaltam que o destino de uma nanopartícula em contato com uma superfície lipídica é determinado pelas propriedades elásticas da membrana e de seu equilíbrio com as forças de atração entre membrana e NP, baseado na teoria elástica para uma esfera interagindo com uma folha bidimensional (CONTINI *et al.*, 2018, 2020). A partir desta teoria e de estudos experimentais, identificaram que há existência de um diâmetro crítico de NP, cujo valor, no caso de membrana (vesícula lipídica) é definido pela razão entre essas duas contribuições energéticas, como verificado na Equação 18 (CONTINI *et al.*, 2020).

$$dc = 2\sqrt{2k/|w|} \quad (18)$$

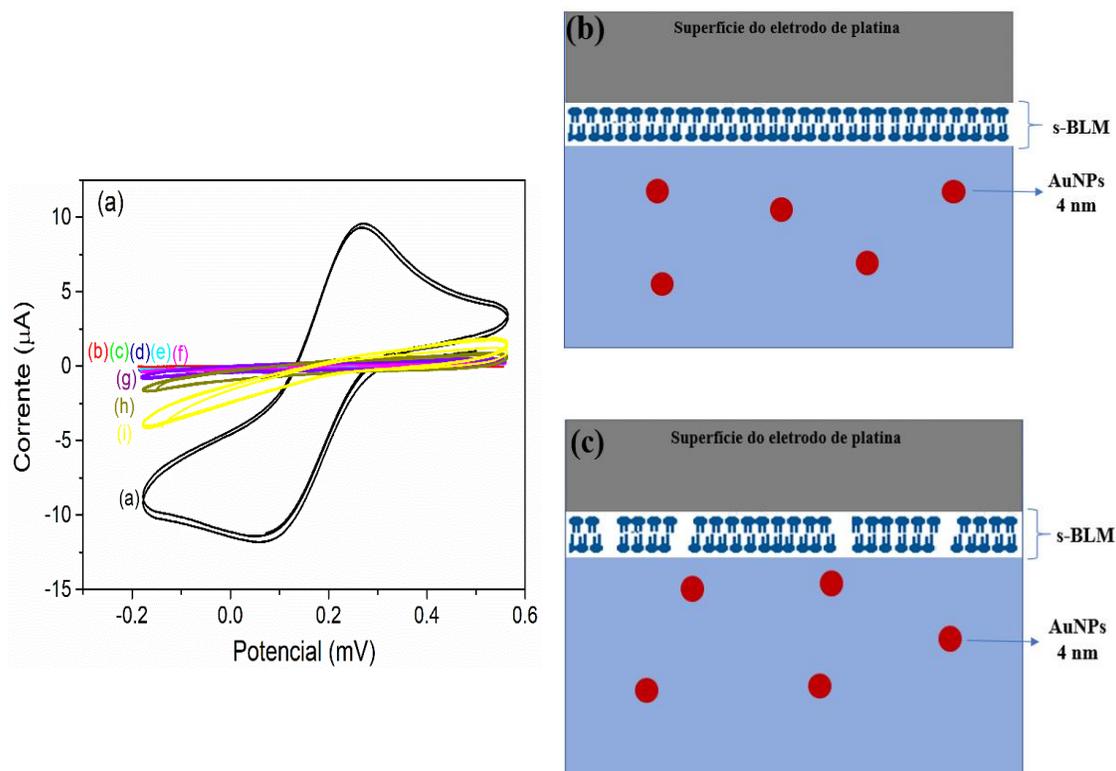
O k se refere as propriedades elásticas da membrana; w se refere a energia de adesão entre o NP com membrana e dc é o diâmetro crítico da NP. Assim, o diâmetro crítico muda de acordo com a natureza de superfície das NPs. Para AuNPs, e com base em dados experimentais e simulação computacional, o diâmetro crítico é menor que 4 nm para membranas lipídicas (SCHNEEMILCH; QUIRKE, 2021).

Resultados experimentais mostram que AuNPs menores (que 4 nm) podem ser envolvidas pela camada de membrana, formando inicialmente uma evaginação de formato tubular em lipossomas, sem rompimento da estrutura (CONTINI *et al.*, 2018). Essas deformações tubulares podem estar presentes como uma agregação cooperativa na superfície da membrana ou agregados tubulares internalizados (CONTINI *et al.*, 2018). Para membranas suportadas, o efeito pode ser semelhante, entretanto a s-BLM possui uma espessura finita ($\cong 4$ nm), e a variação w com o diâmetro da NP leva a uma nova energia de contato w_s (SBL-bicamada lipídica suportada) (CONTINI *et al.*, 2020; SCHNEEMILCH; QUIRKE, 2021). Assim, a energia de contato pode ser diferente de uma bicamada livre e ter diâmetros críticos mais precisos. Esta abordagem revela que o diâmetro crítico das AuNPs é igual a zero, de tal forma que, AuNPs sempre aderem a membrana (CONTINI *et al.*, 2020).

Essa característica, do diâmetro, pode fazer com que a partir do momento que a NP entre em contato com a s-BLM, a camada tente interagir de forma a envolver a mesma (CONTINI *et al.*, 2018). Para tempos iniciais de interação, não deve ocorrer rompimento da mesma, mas para tempos superiores, a camada se romperá devido a tensão que surge da NPs aderidas a bicamada. Esta suposição, foi baseada nos voltamogramas obtidos para interação de AuNPs de 4 nm com a s-BLM (Figura 24 – (a)), onde somente a partir de tempos mais longos (a partir de 80 minutos) é possível observar que a membrana pode ter iniciado a formação de poros em sua estrutura.

Conforme mostrado pelos voltamogramas (Figura 24 – (a)), não houve resposta voltamétrica para a membrana, indicativo de formação e não alteração da mesma, mesmo após contato com as nanopartículas de 4 nm em tempos iniciais. Fica evidenciado que mesmo em tempos mais longos de 60 minutos de contato da nanopartícula com a s-BLM, as AuNPs de 4 nm não foram capazes de perturbar a membrana a ponto de se observar sinal voltamétrico da sonda eletroquímica. Uma hipótese do processo pode ser observada na Figura 24 – (b).

Figura 24 - Análise do processo interacional entre AuNPs de 4 nm com a s-BLM.

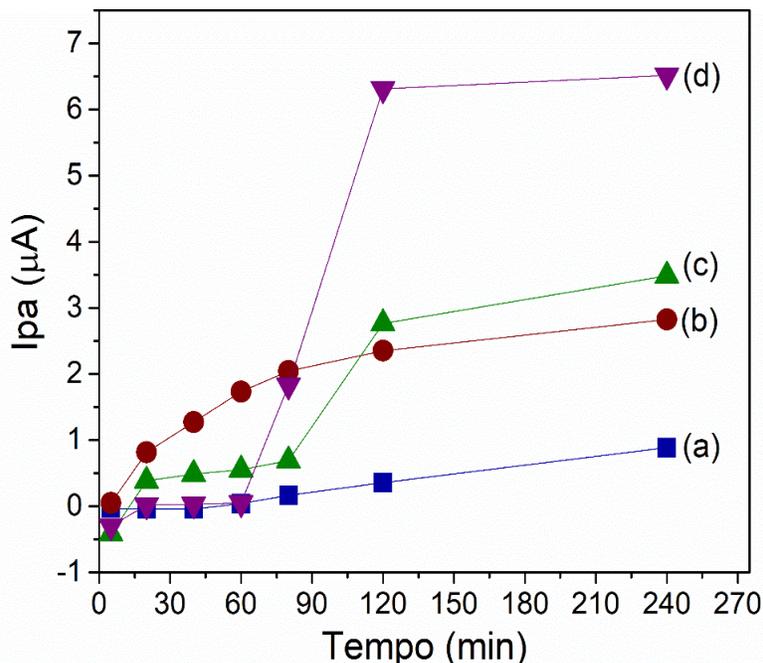


Fonte: Da autora.

Legenda: **(a)** Voltamogramas cíclicos da interação AuNPs 4 nm ($6,72 \times 10^{-8}$ M) com a s-BLM, onde (a) eletrodo limpo; (b) s-BLM; (c) 5; (d) 20; (e) 40; (f) 60; (g) 80; (h) 120 e (i) 240 min; **(b)** Mecanismo proposto para a interação de AuNPs 4 nm com a s-BLM até o tempo de 60 min e **(c)** Mecanismo proposto para a interação de AuNPs 4 nm com a s-BLM após o tempo de 80 min de contato.

Entretanto, a partir do tempo de 80 min de contato, como mostra os voltamogramas, as correntes anódicas decorrentes da transferência de elétrons entre a sonda eletroquímica e o eletrodo de trabalho surgem, evidenciando que pode estar ocorrendo processos evidenciados na Figura 24 – (c), em que se começa a formação de poros na s-BLM, permitindo que íons sonda de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ cheguem até a superfície do eletrodo, e se observe pequenos picos de oxidação e redução. O gráfico de corrente anódica (I_{pa}), versus tempo de interação com as NPs (Figura 25 – (a)), evidencia que AuNPs de 4 nm apresentam corrente de pico praticamente constante, com apenas um pequeno aumento a partir do tempo citado anteriormente. Este resultando vai de encontro a estudos de interação entre AuNPs (de caráter hidrofílico e hidrofóbico) de diâmetro de 4,8 nm com bicamada lipídicas, onde foi observado que esse tamanho de partícula é muito útil para a penetração da membrana sem a desestabilização da mesma decorrente da formação de poros (ZHANG, H. *et al.*, 2015).

Figura 25 - Gráfico da corrente de pico anódica (I_{pa}) versus tempo de contato da s-BLM com as AuNPs de diferentes tamanhos.

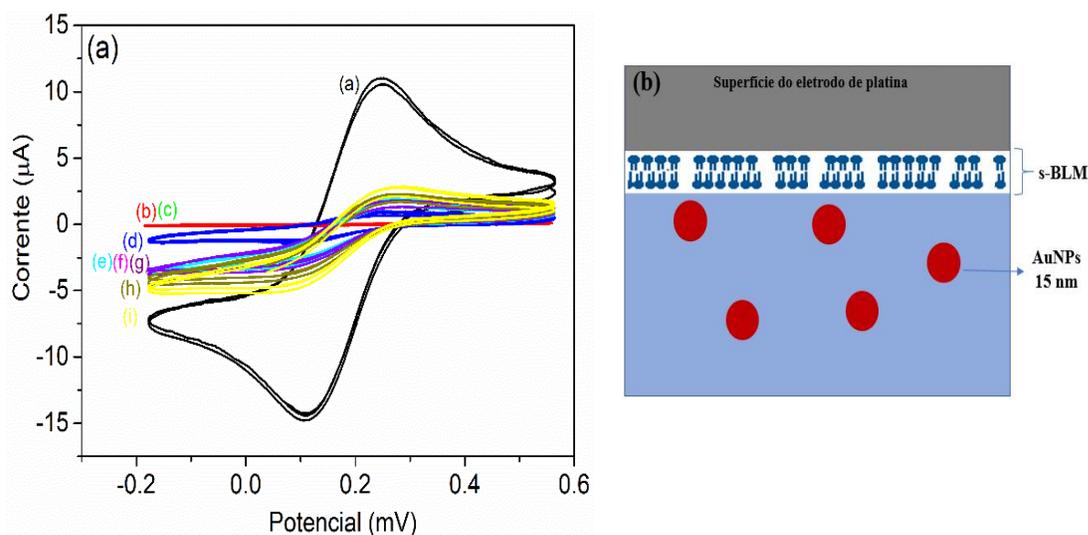


Fonte: Da autora.

Legenda: (a) AuNPs 4 nm; (b) AuNPs 15 nm; (c) AuNPs 40 nm e (d) AuNPs 60 nm.

Um comportamento semelhante pode ser observado nos voltamogramas obtidos para interação de AuNPs de 15 nm com a s-BLM (Figura 26). Entretanto, logo após o contato com as nanopartículas de 15 nm, no tempo de 20 minutos (Figura 26 – (a) linha azul), já é possível notar que a sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ entra em contato com o eletrodo de Pt, surgindo picos de oxidação/redução devido a transferência de elétrons (BARBOSA *et al.*, 2014). A partir desse tempo, os sinais vão aumentando à medida que se aumenta o tempo de contato da nanopartícula com a bicamada suportada. A Figura 26 – (b) traz uma representação do processo que pode estar ocorrendo na superfície do eletrodo que contém a s-BLM. Nesse caso, deve haver maior formação de poros/canais antes mesmo de uma hora de contato da nanopartícula com a s-BLM (KIRSCH; BÖCKMANN, 2016). Isso fica evidenciado pelo Gráfico de I_{pa} versus tempos de contato da AuNP com a s-BLM (Figura 25 – (b)), que exibe um comportamento diferente do observado para AuNPs de 4 nm, ocorrendo um aumento do pico de corrente anódica com o passar do tempo.

Figura 26 - Análise do processo interacional entre AuNPs de 15 nm com a s-BLM.



Fonte: Da autora.

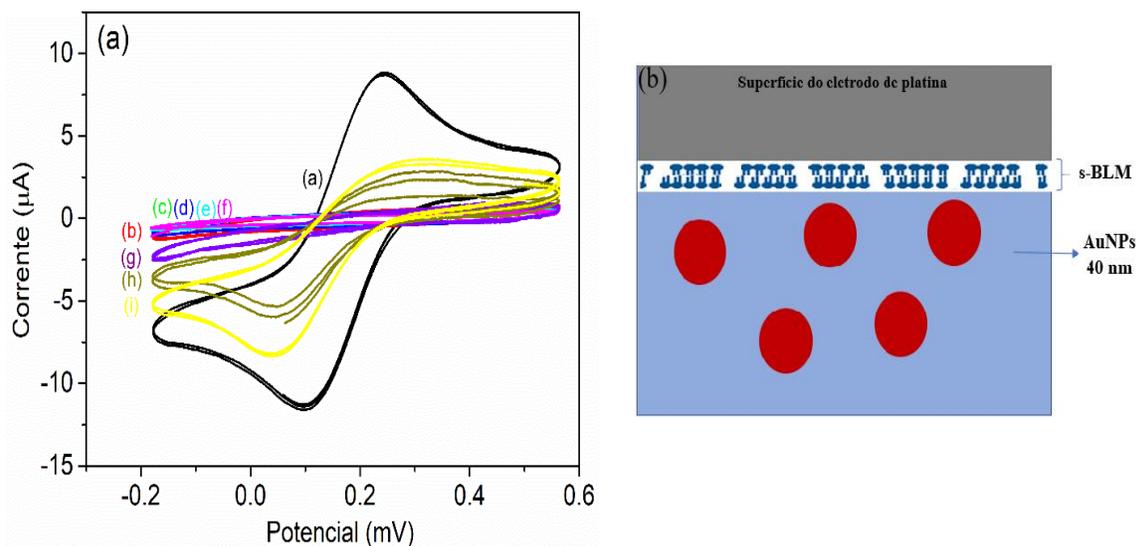
Legenda: **(a)** Voltamogramas cíclicos da interação AuNPs 15 nm ($3,70 \times 10^{-9}$ M) com a s-BLM, onde: (a) Eletrodo limpo; (b) s-BLM; (c) 5; (d) 20; (e) 40; (f) 60; (g) 80; (h) 120 e (i) 240 min após contato e **(b)** Mecanismo proposto para a interação das AuNPs 15 nm com a s-BLM.

Estudos indicam que AuNPs de tamanho médio (25 a 35 nm) e/ou maiores (50 a 60 nm) podem interagir (penetrar) profundamente a camada lipídica de uma vesícula lipídica (CONTINI *et al.*, 2018). Quando AuNPs absorvem na superfície da membrana do lipossoma, este pode responder ajustando seu volume e mudando sua forma (CONTINI *et al.*, 2020). A deformação local da membrana reflete a interação entre a adesão e a resposta elástica do lipossoma. Nesse caso, a membrana muda de forma de acordo com a quantidade e tamanho de AuNPs internalizados ou adsorvidos em sua superfície (CONTINI *et al.*, 2020). Contudo, para membranas suportadas, NPs de tamanhos superiores à 25 nm, podem romper a estrutura da s-BLM, por estas não possuírem a mesmas propriedades elásticas do que vesículas de lipossomas (SCHNEEMILCH; QUIRKE, 2016). Assim, a AuNP de aproximadamente 40 nm terá um efeito mais pronunciado no arranjo da camada lipídica, de forma tal que poderá romper a estrutura da membrana e permitir que solução de íons ferrocianeto entrem em contato com o eletrodo, como pode ser observado pelos sinais eletroquímicos dos voltamogramas apresentados na Figura 27 – (a).

Uma hipótese do que acontece pode ser observado na Figura 27 – (b), em que a membrana adquire poros em sua camada, sendo possível a transferência de elétrons para o eletrodo de platina. Isso fica evidenciado pelo gráfico que relaciona correntes de picos anódicos versus tempo de contato da AuNP de 40 nm com a s-BLM (Figura 25 – (c)) para AuNPs de 40

nm. Para mais, a relação de correntes (I_{pa}/I_{pc}) não deve ser igual a 1 como previsto para a sonda ($Fe(CN)_6^{4-/3-}$), uma vez que que I_{pc} para o tempo de 120 e 240 min possui um pico mais acentuado do que para a I_{pa} (BARBOSA *et al.*, 2011).

Figura 27 - Análise do processo interacional entre AuNPs de 40 nm com a s-BLM.



Fonte: Da autora.

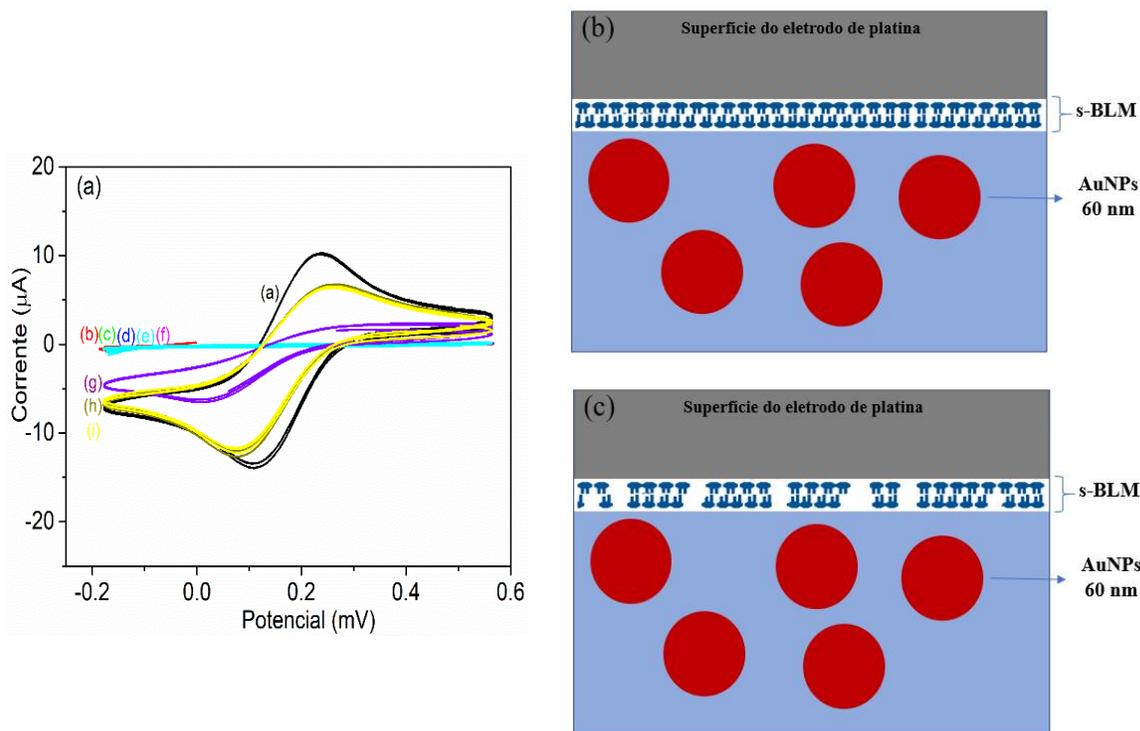
Legenda: **(a)** Voltamogramas cíclicos da interação de AuNPs 40 nm ($2,69 \times 10^{-10}$ M) com a s-BLM, onde: (a) eletrodo limpo; (b) s-BLM; (c) 5; (d) 20; (e) 40; (f) 60; (g) 80; (h) 120 e (i) 240 min após contato e **(b)** Mecanismo proposto para a interação das AuNPs 40 nm com a s-BLM.

Os voltamogramas decorrentes do processo interacional entre dispersões de AuNPs de 60 nm com s-BLM é ilustrado na Figura 28 – (a). A partir do voltamograma, é possível perceber que em tempos de contato menores que 80 minutos não há praticamente nenhuma interação da s-BLM com a NP, não sendo possível inferir sobre possíveis defeitos na estrutura da membrana, que resultaria em sinais eletroquímicos acentuados. O processo pode ser ilustrado como apresentado na Figura 28 – (b), em que a membrana permanece intacta sobre a superfície do eletrodo, como um tapete. Entretanto, a partir do tempo de 80 minutos, observamos que pode ter ocorrido a formação de poros/canais (Figura 28 – (c)), que diminui a resistividade da s-BLM às moléculas de sondagem, fazendo com que as correntes de picos anódica/catódica geradas pelos íons $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ retornem a seus picos característicos conforme o tempo de interação aumenta para 240 min (BARBOSA *et al.*, 2011; BHAT *et al.*, 2016).

O processo do aumento significativo do pico de corrente (I_{pa}) pode ser observado na Figura 25 – (c). Fica evidente que até o tempo de 60 minutos, o fluxo de corrente é matindo

constante. Isto pode estar relacionados a processos adsorptivos e de estabilização da s-BLM, resultando em baixos picos de corrente (Figura 25 – (d)) (BARBOSA *et al.*, 2011). Em 80 minutos a corrente anódica e catódica aumentam, resultado do maior fluxo de transferência de elétrons entre os íons de Fe (CN)₆^{4-/3-} com o eletrodo. Estes resultados evocam defeitos de membrana (s-BLM) que podem ser decorrentes da desestabilização da estrutura da s-BLM, semelhante ao efeito provocado por surfactantes (DU, L. *et al.*, 2006). O efeito observado para AuNPs de 60 nm após 80 min, pode ser resultado de rupturas decorrente da pressão lateral induzida por múltiplas adsorções de AuNP com o aumento do tempo de interação. Esse efeito seria semelhante ao proposto por Bhat e colaboradores, em que simulações sugeriram que o estresse localizado em lipídios, induzido por AuNPs adsorvidas eletrostaticamente, causam fluidização de membranas lipídicas. Como efeito secundário, derivado da pressão lateral induzida por AuNP 60 nm, ocorre a ruptura da membrana ou formação de poros (BHAT *et al.*, 2016).

Figura 28 - Análise do processo interacional entre AuNPs de 60 nm com a s-BLM.



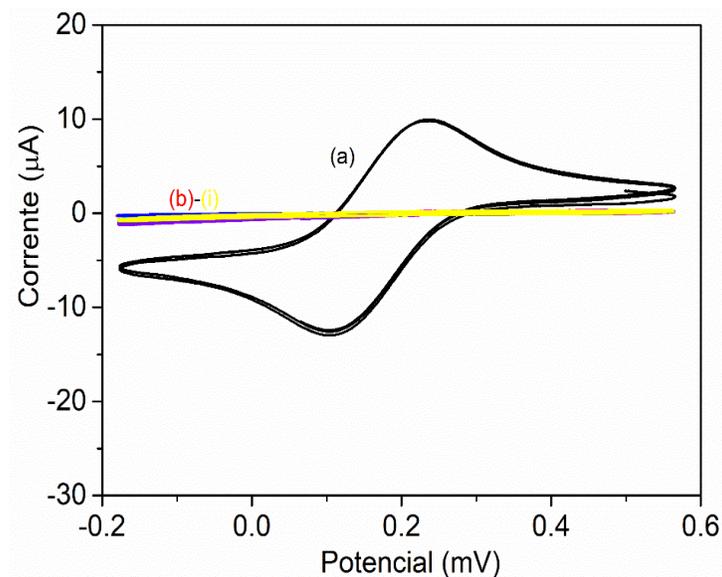
Fonte: Da autora.

Legenda: **(a)** Voltamogramas cíclicos da interação de dispersões de AuNPs 60 nm ($6,11 \times 10^{-11} \text{M}$) com a s-BLM, onde: (a) eletrodo limpo; (b) s-BLM a; (c) 5; (d) 20; (e) 40; (f) 60; (g) 80; (h) 120 e (i) 240 min; **(b)** Mecanismo proposto para a interação das AuNPs 60 nm com a s-BLM em tempos de contato menores de 60 min e **(c)** Mecanismo proposto para a interação das AuNPs 60 nm com a s-BLM para tempos de contato superiores a 80 min.

Um teste para verificar o efeito da concentração de NPs em concentração reduzida (50%), foi conduzida com AuNPs de 15 nm (por se tratar de um tamanho intermediário) em contato com a s-BLM. Os voltamogramas obtidos (Figura 29), não apresentaram picos redox que seriam decorrentes da formação de poros ou desintegração da membrana, conforme apresentado nos voltamogramas da Figura 29. Então, foi verificado que nenhuma corrente faradaica para o íon marcador foi observada com a redução da concentração de AuNPs de 15 nm para 50%.

É possível verificar que a diminuição da concentração faz com que menos partículas estejam presentes na dispersão. Com isso, o efeito observado é nulo, mesmo em tempos suficientemente elevados a membrana permanece intacta e as nanopartículas praticamente não interferem no comportamento da s-BLM.

Figura 29 - Voltamogramas cíclicos da interação AuNPs de 15 nm (concentração reduzida à 50%) com a s-BLM.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) eletrodo limpo; (b) s-BLM suportada; (c) 5; (d) 20; (e) 40; (f) 60; (g) 80; (h) 120 e (i) 240 min após contato.

Esse comportamento evidencia que, além do tamanho das nanopartículas, o número de partículas presentes em solução tem fator predominante no fenômeno de interação (estabilidade ou dessorção) e consequente rompimento da membrana (BHAT *et al.*, 2016). Estudos já demonstraram que a quantidade de partículas desempenha um papel fundamental no processo de interação/penetração das nanopartículas (HE *et al.*, 2015; ZHANG, H. *et al.*, 2015). Concentrações elevadas podem gerar comportamentos tais como agregação, agregação-dispersão ou mesmo agregação-dispersão-reagregação, durante o processo de penetração das partículas que podem causar mudanças nas forças de adesão da NP-bicamada lipídica, afetando fortemente o comportamento de penetração das NPs (ZHANG, H. *et al.*, 2015).

De forma geral, a s-BLM representa um modelo de membrana atraente para estudar processos de ruptura, uma vez que não há fatores interferentes ou complicadores como em uma célula biológica (BHAT *et al.*, 2016; CANEPA *et al.*, 2021). Neste trabalho, a VC foi empregada para estudar as interações de AuNPs com a s-BLM. Os resultados mostram que AuNPs estabilizados com citrato de diâmetro de 4, 15, 40 e 60 nm causaram comportamentos diferentes no modelo, principalmente em tempos maiores de contato entre elas. Assim, foram obtidos voltamogramas característicos de acordo com o tempo de exposição da NP com a-s-BLM, mostrando que à medida que se aumenta o tempo de contato, maior o pico de corrente

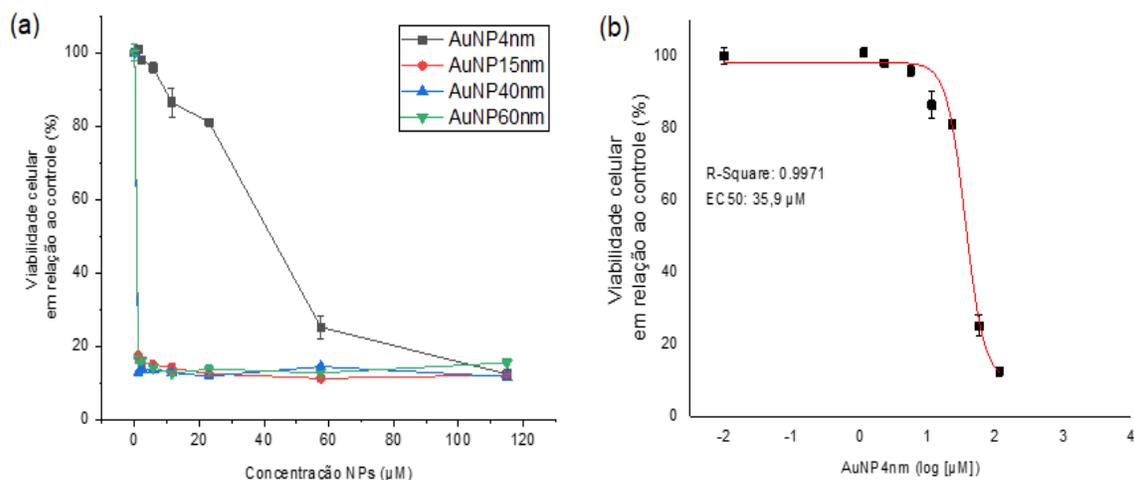
de oxidação/redução. Bailey e colaboradores fizeram uma investigação semelhante utilizando a técnica de Microbalança de quartzo, e verificaram que AuNPs funcionalizadas com citrato de diâmetros de 2, 5, 10 e 40 nm podem adsorver em sua superfície lipídios da bicamada e mudar a conformação da s-BLM. O estresse na bicamada lipídica, causado pela interação de NP, é aliviado pela remoção de algumas moléculas de lipídios, e conseqüentemente esta perda pode estar associada a formação de poros na mesma. Dessa forma, quanto maior a exposição de bicamadas lipídicas em presença de NPs, mais poros podem ser formados (BAILEY *et al.*, 2015).

5.2.1.3 Estudo da citotoxicidade de AuNPs

Os ensaios baseados em células medem a morfologia celular, proliferação, viabilidade, toxicidade, motilidade e produção de metabólitos. Em comparação com os testes de toxicidade em animais, os testes baseados em células são relativamente fáceis e de baixo custo, e a dose do composto de teste pode ser definida com precisão. Linhas celulares, como células de Calu-3, podem ser usadas para comparar a citotoxicidade de nanopartículas que variam em tamanho e química de superfície (PAN; BARTNECK; JAHNEN-DECHENT, 2012).

Os efeitos citotóxicos das AuNPs de diferentes tamanhos foram comparados por meio de um ensaio de toxicidade *in vitro*, utilizando a linhagem celular: Calu-3 (linhagem pulmonar humana). Após incubação por 48 horas, observou-se que, nanopartículas de aproximadamente 15, 40 e 60 nm mostraram uma alta toxicidade sobre as células utilizadas, como mostra o gráfico da Figura 30 – (a). Entretanto, AuNPs de 4 nm se mostraram menos tóxicas como mostra o gráfico da Figura 30 – (b), em que apenas para concentrações mais elevadas houve uma redução da viabilidade celular. O tamanho das AuNPs interfere na cinética de saturação do processo de endocitose. Sendo assim, as dimensões das nanopartículas estão diretamente ligadas à sua toxicidade (CHITHRANI; GHAZANI; CHAN, 2006).

Figura 30 - Curvas representativas de dose-resposta sigmoidal de AuNPs de diferentes tamanhos com a célula Calu-3.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) AuNPs de diferentes tamanhos e (b) Resultados para AuNP 4nm em uma regressão não-linear de uma equação semi-logarítmica (dose-resposta).

5.2.2 Estudo da interação HSA-PQs por SPR

As proteínas são componentes da membrana celular, que determinam estrutura e a forma das células, além de coordenar processos de defesa, transporte de substâncias, controlar e regular funções celulares e reações químicas, e importante função de comunicação celular (ALMEIDA, 2016; CAGNIN, 2010). Por isso se justifica a necessidade de se estudar os processos interacionais destas com nanocristais que tem sido utilizado como marcadores celulares e carreadores de fármacos. Nesta seção será apresentado a caracterização cinética e termodinâmica para interação de pontos quânticos de CdTe@MPA e CdTe@TGA com uma importante proteína de transporte a albumina serica humana (HSA) (MACIAŹEK-JURCZYK *et al.*, 2018).

5.2.2.1 Estudo cinética das interações entre HSA-PQs

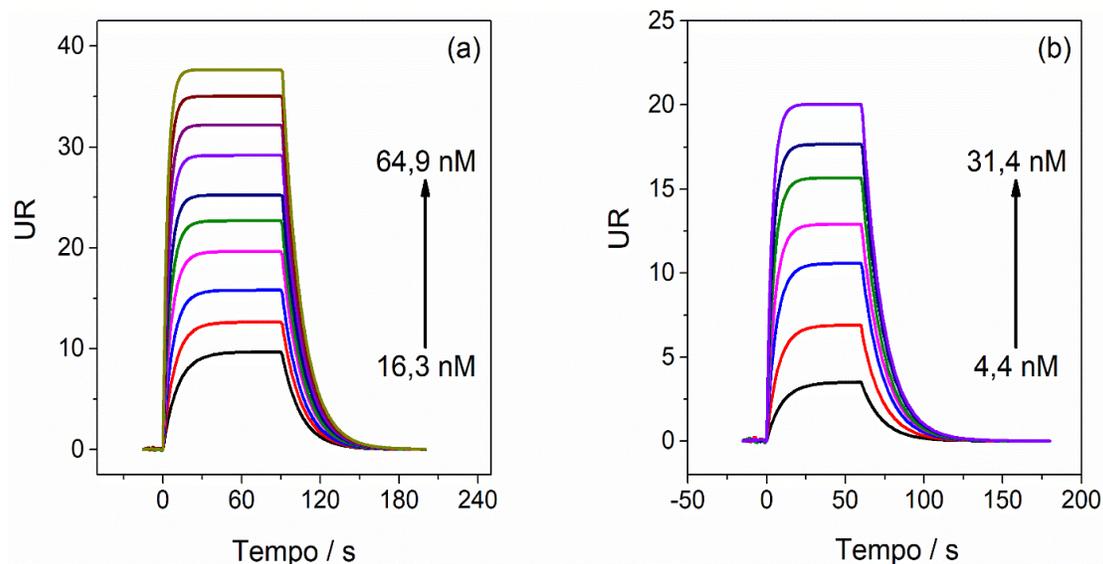
Devido a crescente utilização de PQs como possíveis marcadores biológicos, se faz cada vez mais necessário investigar a forma como estes nanocristais se comportam na presença de sistemas supramoleculares biológicos como proteínas e/ou membranas. Este tipo de pesquisas ainda são escassas e surgem como uma necessidade de entender possíveis mecanismos de

interação dessas NPs com organismos vivos, revelando processos celulares de internalização, degradação e eliminação desses nanomateriais (HU, Y. *et al.*, 2020). Isso é de fundamental importância para estabelecer procedimentos de segurança para o uso dessas NPs em novos produtos, como cosméticos, em terapias, como biomarcadores, como transportadores de drogas ou qualquer outra aplicação que coloque nanomateriais em contato com a célula (CEDERVALL *et al.*, 2007). Particularmente, a interação entre proteínas plasmáticas (especialmente algumas proteínas relacionadas à processos de difusão de substâncias como a HSA) com PQs de CdTe pode fornecer informações importantes para explorar os mecanismos de transporte de NPs através do sangue até um dado alvo no interior da célula (YAN, R. *et al.*, 2018). Uma abordagem padrão desse tipo de estudo envolve investigar interações entre PQs e uma proteína modelo, como a HSA, a fim de caracterizar o processo sob o ponto de vista das energias envolvidas nas interações (aspectos termodinâmicos) e da dinâmica interacional (aspectos cinéticos). A técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR), possibilita realizar num só experimento essas duas abordagens.

Neste trabalho, para investigar os processos de interação utilizando a técnica de SPR, a proteína HSA (ligante) foi fixada na superfície de uma plataforma (sensor chip CM5) em baixa densidade por meio de acoplamento amina. Após a imobilização da proteína, soluções de tampão contendo PQs sintetizados na etapa anterior, em diferentes concentrações, foram injetadas no equipamento de SPR e bombeadas por um canal de forma a ter contato com a superfície onde a HSA foi fixada. Os perfis de unidades de ressonância (UR) como função do tempo (sensorgramas), foram então obtidos para seis temperaturas diferentes (285,15; 289,15; 293,15; 297,15; 298,15 e 301,15 K). A Figura 31 mostra os sensorgramas obtidos como resultados da cinética da interação dos diferentes PQs investigados para CdTe@MPA (16,3 – 64,9 nM) (Figura 29 – (a)) e CdTe@TGA (4,4 – 31,4 nM) (Figura 29 – (b)) com a HSA imobilizada em baixa densidade (3893 UR) na superfície do chip Biacore CM5 a 298,15 K. Os sensorgramas obtidos nas outras temperaturas de estudo são apresentados no Apêndice B e C.

Considerando que a resposta ressonante depende do índice de refração do ambiente acima da superfície do chip (camada superficial ≈ 300 nm), eventos de ligação, como a associação de moléculas e/ou dissociação do complexo, levarão a alterações nesse índice (DE PAULA *et al.*, 2017). Os perfis registrados foram similares em todas as concentrações de PQs. Pode-se observar duas regiões distintas (uma curva ascendente e uma descendente) presentes em cada um dos sensorgramas, correspondendo a diferentes eventos de ligação que ocorreram durante o experimento cinético.

Figura 31 - Sensorgramas (UR vs. Tempo/s) para interação da proteína com os pontos quânticos.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) HSA-CdTe@MPA (16,3 - 64,9 nM) e (b) HSA-CdTe@TGA (4,4 - 31,4 nM) à 298,15K.

A cada incremento na concentração dos PQs avaliados, os sensorgramas indicam que a UR aumenta durante a fase de associação (Região I), a partir do momento da injeção (t_0), devido ao fenômeno de ligação dos PQs na HSA imobilizada. Embora, também ocorra fenômenos de dessorção nesta etapa, o que predomina é a associação dos PQs com a HSA com a ligação ocorrendo em taxas mais altas, atingindo eventualmente um valor máximo no tempo de ressonância (t_m). Em todas as curvas na Figura 31, observa-se que foram alcançados platôs (região II), indicando que as velocidades de associação e dissociação se tornam iguais. Após o platô, observou-se que o valor da UR diminui com o passar do tempo até retornar à linha de base. Isto indica que neste estágio o processo de dissociação dos PQs da HSA domina (região III, quebra da interação PQs-HSA). Após de UR retornar à linha de base, apenas a solução tampão, sem PQs, fluiu sobre o HSA imobilizada. Comportamento semelhante foi observado para todos os PQs do presente estudo, o que está condizente com os resultados relatados por Hu e colaboradores (2020). Ademais, resultados similares foram encontrados para interação de PQs em outras temperaturas, como pode ser observado no Apêndice B e C.

Independentemente da temperatura e das concentrações das nanopartículas utilizadas no experimento cinético, os sensorgramas obtidos para a interação entre HSA e CdTe@MPA e

CdTe@TGA apresentaram perfis semelhantes, demonstrando uma interação específica proteína-PQ.

Com base no modelo de ligação monovalente, $PQ + HSA \rightleftharpoons PQ-HSA$, a constante cinética de dissociação (k_d) e a constante observada (k_{obs}) das interações HSA–CdTe@MPA ou HSA–CdTe@TGA foram determinadas pelo ajuste global do sensorgrama (Figura 31) para as equações de velocidade integral (Equação 19 e 20) (COELHO *et al.*, 2019).

$$UR(t) = UR_{\max(t_{\infty})} [1 - e^{-k_{obs}(t-t_0)}] \quad (19)$$

$$UR(t) = UR(t)e^{-k_d(t-t_m)} \quad (20)$$

Neste caso, $UR(t)$ é a resposta SPR no tempo t , $UR(t_m)$ é o sinal SPR no qual a curva exponencial descendente do sensorgrama começa, e $[UR_{\max}(t_{\infty})]$ denota as unidades de ressonância obtidas em um tempo infinito (t_{∞}).

Como os valores de k_{obs} eram linearmente dependentes da concentração de PQ ([PQs]) (Figura do Apêndice D), a constante cinética de associação (k_a) pode ser facilmente calculada a partir da inclinação da curva de k_{obs} versus [PQs] (Equação 21).

$$k_{obs} = k_a[PQs] + k_d \quad (21)$$

A Tabela 5 mostra as constantes cinéticas (k_a e k_d) para as interações PQ-HSA determinadas em cada temperatura estudada e em pH 7,4.

Tabela 5 - Constantes de velocidade para a associação (k_a) e dissociação (k_d) de HSA-CdTe@MPA e HSA-CdTe@TGA.

T	HSA-CdTe@MPA		HSA-CdTe@TGA	
	k_a	k_d	k_a	k_d
K	$10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	s^{-1}	$10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	s^{-1}
285,15	$2,19 \pm 0,12$	$0,0275 \pm 0,0014$	$1,95 \pm 0,11$	$0,0412 \pm 0,0023$
289,15	$2,67 \pm 0,16$	$0,0365 \pm 0,0010$	$2,95 \pm 0,17$	$0,0517 \pm 0,0032$
293,15	$3,33 \pm 0,18$	$0,0492 \pm 0,0020$	$4,36 \pm 0,24$	$0,0609 \pm 0,0019$
297,15	$4,11 \pm 0,29$	$0,0638 \pm 0,0034$	$5,84 \pm 0,19$	$0,0705 \pm 0,0023$
298,15	$4,37 \pm 0,27$	$0,0685 \pm 0,0018$	$6,85 \pm 0,23$	$0,0756 \pm 0,0031$
301,15	$5,11 \pm 0,25$	$0,0845 \pm 0,0037$	$8,38 \pm 0,31$	$0,0826 \pm 0,0042$

Fonte: Da autora.

Para ambos os PQs interagindo com HSA, os valores de k_a e k_d aumentaram com o aumento da temperatura. Esse comportamento indicou que quanto maior a energia cinética molecular média, maior a velocidade de associação entre as moléculas livres e a velocidade de dissociação do complexo termodinamicamente estável.

Exceto para o caso em 285,15 K, o aumento no número de grupos CH_2 na estrutura da molécula funcionalizante (Figura 2) promoveu uma diminuição no número de complexos HSA-PQ formados por segundo (IDOWU; LAMPRECHT; NYOKONG, 2008). Em contraste, a taxa de dissociação dos complexos termodinamicamente estáveis HSA-CdTe@TGA (k_d), foi maior do que a de HSA-CdTe@MPA. Esses resultados demonstraram que PQs com menos grupos CH_2 em sua superfície tinham uma velocidade relativamente maior para se ligar a HSA, embora a dissociação dos complexos termodinamicamente estáveis também ocorresse rapidamente.

Recentemente, Hu e colaboradores (HU, Y. *et al.*, 2020), estudaram parâmetros cinéticos e termodinâmicos entre PQs de CdTe (5 – 6 nm) funcionalizados com L-glutaciona/L-cisteína e algumas proteínas plasmáticas, incluindo HSA. Usando SPR, os autores calcularam os valores k_a e k_d para o complexo HSA-CdTe@L-GSH/L-Cys como $2,72 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $1,65 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, a 298,15 K. Estes resultados mostraram que a associação entre HSA e CdTe@TGA ou CdTe@MPA era aproximadamente três ordens de magnitude superior do que a associação HSA-CdTe@L-GSH/L-Cys. A constante dissociação dos complexos foi aproximadamente três vezes maior para CdTe@TGA e CdTe@MPA, do que para HSA-CdTe@L-GSH/L-Cys. Os valores relativamente elevados de k_a e k_d obtidos neste trabalho podem estar associados ao maior diâmetro das nanopartículas formadas com L-GSH/L-Cys, enquanto PQs formados por TGA e MPA apresentarem menores tamanhos (2–3 nm). No

entanto, para melhor compreender a dinâmica de complexação entre HSA e CdTe@TGA ou CdTe@MPA, é necessário determinar os parâmetros energéticos associados à formação do complexo ativado por HSA - PQ, ou seja, a energia de ativação (E_x^\ddagger), mudança de energia livre de Gibbs (ΔG^\ddagger), mudança de entalpia (ΔH^\ddagger), e mudança de entropia de ativação ($T\Delta S^\ddagger$).

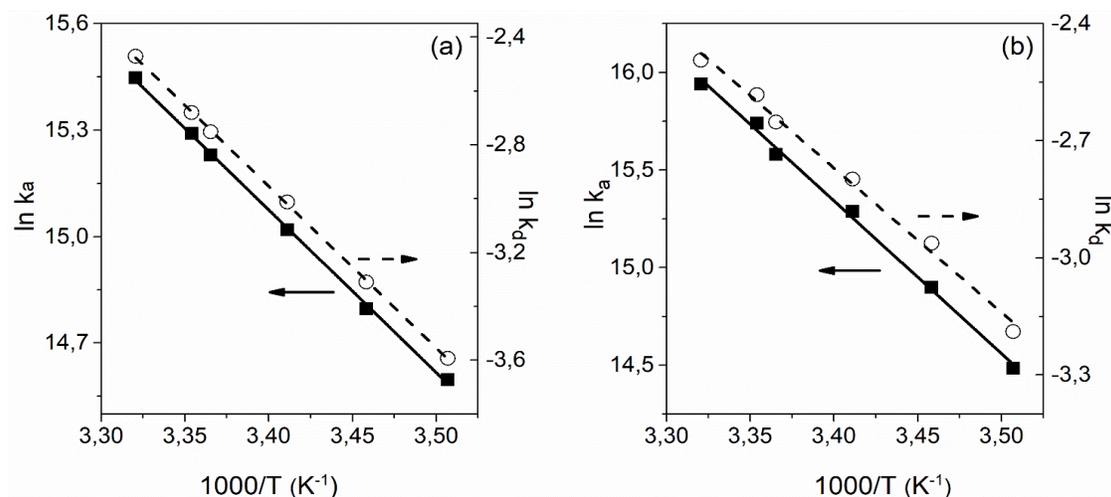
5.2.2.2 Parâmetros energéticos relacionados à formação do complexo ativado por HSA-PQs

A abordagem de Arrhenius é amplamente aceita para descrever a influência da temperatura nas taxas de processos químicos, como as interações intermoleculares (WANG, W.; ROBERTS, 2013). Na teoria do estado de transição (TST), os gráficos de Arrhenius, ou seja, $\ln k_a$ ou $\ln k_d$ versus $1/T$ (Figura 32), permitem o cálculo da energia de ativação dos complexos de transição pela equação 22 (PETERSSON, 2000).

$$E_x^\ddagger(T) = -R \left(\frac{d \ln k_x}{dT} \right) \quad (22)$$

Nesta equação, k_x é a constante de taxa de associação ($x = a$) ou dissociação ($x = d$), E_x^\ddagger é a energia de ativação e R é a constante universal dos gases.

Figura 32 - Gráficos de Arrhenius de $\ln k_a$ (■) e $\ln k_d$ (○), associados às interações HSA–CdTe@MPA e HSA–CdTe@TGA como funções da temperatura.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) HSA–CdTe@MPA e (b) HSA–CdTe@TGA. A barra de erro de cada medição foi menor que o tamanho dos símbolos.

O gráfico de Arrhenius produziu uma linha reta com uma inclinação igual a $-E_x^\ddagger/R$, e essa linearidade indicou que a barreira de energia potencial para a formação do complexo ativado era independente da temperatura na faixa analisada (REZENDE *et al.*, 2019). Embora a interação de biomoléculas e nanopartículas seja conhecida por ocorrer frequentemente com mudanças conformacionais nas proteínas, a linearidade do gráfico de Arrhenius (Figura 32 - $\ln k_a$ ou $\ln k_d$ vs. $1/T$) sugeriu que a formação de um complexo ativado entre HSA e CdTe @ MPA ou CdTe @ TGA ocorreu sem extensas mudanças conformacionais na proteína ou ligante do PQ, isto é, um processo simples de uma etapa envolvendo a associação de reagentes livres ou dissociação de complexos termodinamicamente estáveis (REZENDE *et al.*, 2019). Além disso, Motevalian e colaboradores, realizaram estudos estruturais usando espectroscopia de fluorescência e descobriram que a formação de uma coroa protéica entre HSA e PQs de CdTe capeados por TGA não teve efeitos adversos na estrutura da proteína, confirmando nossa hipótese (MOTEVALLIAN *et al.*, 2020).

A energia de ativação (E_x^\ddagger) necessária para formar o complexo ativado a partir da associação de moléculas livres (E_a^\ddagger) e a dissociação do complexo termodinamicamente estável (E_d^\ddagger) são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros energéticos para a formação do complexo de transição de HSA – PQs.

HSA – CdTe@MPA						
T	Fase de associação (a)			Fase de dissociação (d)		
	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ mol ⁻¹					
285,15	35,76 ± 1,95	35,12 ± 2,01	0,64 ± 0,034	47,59 ± 2,32	78,25 ± 3,25	-30,66 ± 1,89
289,15	35,72 ± 2,01	35,17 ± 1,97	0,55 ± 0,028	47,55 ± 2,67	78,70 ± 3,05	-31,14 ± 1,75
293,15	35,69 ± 1,79	35,15 ± 1,85	0,55 ± 0,031	47,52 ± 2,81	79,09 ± 2,98	-31,57 ± 1,55
297,15	35,66 ± 1,85	35,14 ± 1,95	0,52 ± 0,027	47,49 ± 3,05	79,56 ± 2,71	-32,07 ± 1,62
298,15	35,65 ± 2,02	35,12 ± 1,88	0,53 ± 0,025	47,48 ± 2,45	79,66 ± 2,85	-32,18 ± 1,53
301,15	35,62 ± 2,04	35,10 ± 2,03	0,52 ± 0,028	47,46 ± 2,95	79,96 ± 2,79	-32,51 ± 1,65
	$E_a^\ddagger = 38,13 \pm 2,05$			$E_d^\ddagger = 49,96 \pm 2,55$		
HSA – CdTe@TGA						
T	Fase de associação (a)			Fase de dissociação (d)		
	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ mol ⁻¹					
285,15	62,73 ± 3,15	35,39 ± 1,75	27,34 ± 1,55	28,41 ± 1,45	77,29 ± 4,05	-48,88 ± 3,05
289,15	62,69 ± 3,22	34,93 ± 1,92	27,77 ± 1,42	28,37 ± 1,62	77,86 ± 4,21	-49,49 ± 2,93
293,15	62,66 ± 2,95	34,49 ± 2,05	28,17 ± 1,59	28,34 ± 1,55	78,57 ± 4,15	-50,23 ± 2,57
297,15	62,63 ± 3,05	34,27 ± 1,87	28,36 ± 1,47	28,31 ± 1,85	79,32 ± 3,85	-51,01 ± 2,61
298,15	62,62 ± 3,11	34,00 ± 1,95	28,62 ± 1,41	28,30 ± 1,75	79,42 ± 3,90	-51,12 ± 2,53
301,15	62,59 ± 3,03	33,86 ± 2,55	28,73 ± 1,48	28,27 ± 1,41	80,02 ± 3,99	-51,75 ± 2,40
	$E_a^\ddagger = 65,10 \pm 4,05$			$E_d^\ddagger = 30,78 \pm 2,05$		

Fonte: Da autora.

Legenda: (a) associação entre as moléculas livres de HSA e PQs de CdTe@MPA e CdTe@TGA e (d) dissociação de complexos termodinamicamente estáveis de HSA–CdTe@MPA e HSA–CdTe@TGA, em pH 7,4 e em diferentes temperaturas.

Independentemente da estrutura química do ligante presente na superfície do PQ (MPA ou TGA), os valores E_x^\ddagger foram positivos e independentes da temperatura para os processos de associação e dissociação. No entanto, a magnitude dependeu da molécula funcionalizante do PQ. A formação dos complexos de transição de HSA–CdTe@TGA ($[HSA - CdTe@TGA]^\ddagger$) da associação livre de HSA e PQs demandou 70% mais energia ($E_{a-TGA}^\ddagger = 65,10 \text{ kJ mol}^{-1}$) em comparação com a formação de $[HSA - CdTe@MPA]^\ddagger$ ($E_{a-MPA}^\ddagger = 38,13 \text{ kJ mol}^{-1}$). Por outro lado, a dissociação do complexo HSA–CdTe@MPA termodinamicamente estável ($[HSA - CdTe@MPA]^\circ$), para formar o estado de transição, requer valores E_d^\ddagger mais elevados ($E_{d-MPA}^\ddagger = 49,96 \text{ kJ mol}^{-1}$) do que para a formação $[HSA - CdTe@TGA]^\ddagger$ ($E_{d-TGA}^\ddagger = 30,78 \text{ kJ mol}^{-1}$).

A interação HSA - PQ ocorreu através da superfície das nanopartículas, que forneceram dois sítios ativos: os grupos carboxílicos nas moléculas funcionalizantes (sítio 1) e a superfície metálica dos PQs (sítio 2). Assim, os valores E_x^\ddagger podem ser descritos como uma combinação linear das energias de ativação de cada local de interação, como descrito pela equação 23.

$$E_x^\ddagger = \alpha \cdot E_{x,\text{sit1}}^\ddagger + (1 - \alpha)E_{x,\text{sit2}}^\ddagger \quad (23)$$

Conforme a equação, α é a fração do total de locais de interação formados pelos grupos carboxílicos.

Os valores E_x^\ddagger resultaram de uma combinação de energias sendo absorvidas no processo de quebra das interações (H₂O-H₂O nas camadas de solvatação de PQs e HSA; contra-íon-PQs e contra-íon-HSA), e liberadas quando novos foram formados (HSA-PQs e H₂O-H₂O). Portanto, os valores positivos de E_a^\ddagger , para ambos os PQs, mostraram que mais energia foi absorvida no processo de dessolvatação do que liberada nas interações diretas HSA-PQs e H₂O-H₂O (ARAÚJO *et al.*, 2013). Além do mais, a dessolvatação dos dois locais contribuiu de forma diferente para os valores E_a^\ddagger . Os sítios metálicos, que são mais hidrofóbicos, requerem uma quantidade maior de energia para a dessolvatação do que os sítios carboxílicos (ARAÚJO *et al.*, 2013).

Em contraste, $E_{a-TGA}^\ddagger > E_{a-MPA}^\ddagger$, evidenciando que a dinâmica molecular da quebra e formação de interações, bem como a solvatação e dessolvatação do ligante livre induzida pelos processos interacionais, são diferentes quando a molécula funcionalizante do PQ é alterada. Uma vez que PQs de CdTe têm valores quase iguais de raio hidrodinâmico, e a composição atômica metálica da superfície e estruturas químicas das moléculas funcionalizantes são muito semelhantes, a diferença pronunciada entre os valores de E_{x-MPA}^\ddagger e E_{x-TGA}^\ddagger devem estar relacionados às diferentes densidades de cobertura de superfície das nanopartículas (número de ligantes por unidade de área de superfície do PQ). Foi descrito na literatura científica que os PQs capeados por MPA têm uma densidade de cobertura de superfície maior do que os PQs capeados por TGA (SCHNEIDER *et al.*, 2016). Ou seja, quando os PQs são funcionalizados com MPA, há mais sítios carboxílicos disponíveis para interagir com HSA e, conseqüentemente, menos sítios ativos metálicos na superfície, do que quando TGA é a molécula funcionalizante. Portanto, $E_{a-TGA}^\ddagger > E_{a-MPA}^\ddagger$, porque para a formação de $[\text{HSA} - \text{CdTe@TGA}]^\ddagger$, mais energia é necessária para dessolvatar os sítios metálicos, e menos energia é liberada da interação entre os sítios carboxílicos e HSA.

É bem conhecido que o processo dinâmico de formação ou dissociação do complexo HSA-PQ termodinamicamente estável ($[HSA - PQs]^{\circ}$) passa por um estado intermediário no qual um complexo ativado ($[HSA - PQs]^{\ddagger}$) é formado (COELHO *et al.*, 2019; PRIVALOV, 1996). Assim, E_d^{\ddagger} é entendido como uma barreira energética para que o complexo termodinamicamente estável se torne um complexo de transição. No entanto, essa barreira de potencial pode ser analisada inversamente, ou seja, a energia liberada quando o complexo intermediário é convertido em um complexo termodinamicamente estável ($-E_d^{\ddagger}$). Portanto, o valor mais negativo de $-E_{d-MPA}^{\ddagger}$ ($-49,96 \text{ kJ mol}^{-1}$), foi devido ao maior número de sítios carboxílicos nos PQs capeados por MPA que, conseqüentemente, levou a mais energia sendo liberada quando o complexo $[HSA - CdTe@MPA]^{\circ}$ foi formado, em comparação com $[HSA - CdTe@TGA]^{\circ}$ ($-E_{d-TGA}^{\ddagger} = -30,78 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Além da E_x^{\ddagger} , para entender melhor a formação de $[HSA - PQs]^{\ddagger}$, os parâmetros energéticos de ativação (ΔG_x^{\ddagger} , ΔH_x^{\ddagger} , ΔS_x^{\ddagger}) para a associação ($x = a$) e dissociação ($x = d$) tiveram os processos determinados pelas equações 24, 25 e 26, respectivamente, e os resultados estão listados na Tabela 6.

$$\Delta G_x^{\ddagger} = -RT \ln \left(\frac{k_x h}{K_B T} \right) \quad (24)$$

$$\Delta H_x^{\ddagger} = E_x^{\ddagger} - RT \quad (25)$$

$$T \Delta S_x^{\ddagger} = \Delta H_x^{\ddagger} - \Delta G_x^{\ddagger} \quad (26)$$

Aqui, K_B e h são constantes de Boltzmann's e de Planck's, respectivamente.

Os valores de ΔG_a^{\ddagger} não foram afetados pela mudança da molécula funcionalizante na superfície do PQ, o mesmo ocorreu para ΔG_d^{\ddagger} , e ambos permaneceram quase constantes ao longo da faixa de temperatura investigada. No entanto, ΔG_d^{\ddagger} sempre foi maior do que ΔG_a^{\ddagger} para a interação com os dois PQs, indicando que os $[HSA - PQs]^{\ddagger}$ tinham estruturas configuracionais/conformacionais e interações que eram mais semelhantes às das moléculas livres de PQs e HSA do que aquelas do complexo termodinamicamente estável. A maior similaridade estrutural entre os complexos de transição e espécies químicas de interação livre mostrou que a formação de $[HSA - PQs]^{\ddagger}$, a partir de moléculas livres, ocorreu principalmente

pelas interações de sítios da superfície do metal do PQ com HSA e por apenas uma pequena fração de ligações de hidrogênio presentes em $[\text{HSA} - \text{PQs}]^\circ$. Com base na análise, concluiu-se que a formação de $[\text{HSA} - \text{PQs}]^\ddagger$ pela associação dos PQs com a HSA ocorreu mais rápido do que pela dissociação de $[\text{HSA} - \text{PQs}]^\circ$. Para elucidar se esta alta velocidade do processo de associação foi devido às interações diretas entre HSA e PQs ou às diferentes configurações assumidas por este sistema, foram calculados os valores de ΔH_x^\ddagger e ΔS_x^\ddagger .

Embora os valores ΔG_x^\ddagger para PQs de CdTe funcionalizados com MPA ou TGA fossem muito semelhantes, o custo de energia entálpica para a associação de HSA com CdTe@MPA ($\Delta H_{a-MPA}^\ddagger = 35,65 \text{ kJ mol}^{-1}$ em 298,15 K) foi menor do que para a associação com CdTe@TGA ($\Delta H_{a-TGA}^\ddagger = 62,62 \text{ kJ mol}^{-1}$ em 298,15 K). No entanto, a dissociação de $[\text{HSA} - \text{CdTe@MPA}]^\circ$ exigiu mais energia ($\Delta H_{d-MPA}^\ddagger = 47,48 \text{ kJ mol}^{-1}$ em 298,15 K) em comparação com dissociação de $[\text{HSA} - \text{CdTe@TGA}]^\circ$ ($\Delta H_{d-TGA}^\ddagger = 28,30 \text{ kJ mol}^{-1}$ em 298,15 K). Este comportamento pode ser explicado pelas mesmas ideias propostas acima para os valores E_x^\ddagger (a diferença entre ΔH_x^\ddagger e E_x^\ddagger é apenas RT), pois esses dois parâmetros expressam o custo de energia para a formação de $[\text{HSA} - \text{PQs}]^\ddagger$.

As diferentes estruturas químicas das moléculas funcionalizantes que promoveram diferentes coberturas de superfície nos PQs também afetaram os parâmetros $T\Delta S_x^\ddagger$. Embora a formação de $[\text{HSA} - \text{PQs}]^\ddagger$ da associação livre de HSA e PQs fosse entropicamente favorável para a interação com ambos os PQs, a cobertura de superfície relativamente alta induziu um pequeno aumento de entropia ($T\Delta S_{a-MPA}^\ddagger - T\Delta S_{a-TGA}^\ddagger = -28 \text{ kJ mol}^{-1}$). Para o processo de dissociação, os valores de $T\Delta S_d^\ddagger$ foram negativos, e a diferença ($T\Delta S_{d-MPA}^\ddagger - T\Delta S_{d-TGA}^\ddagger$) foi de aproximadamente 19 kJ mol^{-1} . Apesar disso, independentemente do grupo químico na superfície dos PQs, os valores de $T\Delta S_x^\ddagger$ para os processos de associação e dissociação essencialmente não variaram com a temperatura.

Para a etapa de associação de ligante livre, os valores de $T\Delta S_a^\ddagger$ foram positivos por causa do ganho entrópico da dessolvatação e liberação de contra-íons da camada dupla elétrica das moléculas que superaram a perda de entropia configuracional devido à formação do complexo $[\text{HSA} - \text{PQs}]^\ddagger$. A diferença entre os valores de $T\Delta S_a^\ddagger$ obtidos para os dois PQs ($T\Delta S_{a-TGA}^\ddagger > T\Delta S_{a-MPA}^\ddagger$) mostraram que devido à maior quantidade de sítios metálicos disponíveis (mais hidrofóbico) nos PQs capeados por TGA, um número maior de moléculas de H_2O foram liberadas, promovendo um ganho entrópico significativo quando o complexo $[\text{HSA} - \text{CdTe@TGA}]^\ddagger$ foi formado ($28,62 \text{ kJ mol}^{-1}$, em 298,15 K), em comparação com a

formação $[HSA - CdTe@MPA]^{\ddagger}$ ($0,53 \text{ kJ mol}^{-1}$, em $298,15 \text{ K}$). Da mesma forma, quando complexos termodinamicamente estáveis foram formados a partir de $[HSA - PQs]^{\ddagger}$, $-T\Delta S_{d-TGA}^{\ddagger} > -T\Delta S_{d-MPA}^{\ddagger}$. Essa diferença foi por conta do número relativamente baixo de sítios carboxílicos nos PQs capeados por TGA que, conseqüentemente, formaram poucas ligações de hidrogênio com a HSA. A ligação de hidrogênio é uma interação cooperativa e orientada que otimiza o número e a intensidade das interações e induz um aumento da perda de entropia rotacional. Quando o complexo $[HSA - CdTe@MPA]^{\circ}$ foi formado, a taxa de ganho de entropia diminuiu porque a interação da ligação de hidrogênio do complexo de HSA-CdTe@MPA causou uma diminuição significativa na entropia rotacional do sistema.

5.2.2.3 Caracterização termodinâmica das interações HSA-PQ

Além da caracterização cinética da interação HSA - PQ, um estudo termodinâmico é essencial para a compreensão dos mecanismos de formação dos complexos corona de PQ-proteína, bem como seus mecanismos de transporte no sangue. Embora a termodinâmica de diferentes interações HSA-PQ tenha sido sistematicamente investigada, usando várias técnicas espectroscópicas, os estudos termodinâmicos sobre a interação HSA-CdTe@MPA ainda são poucos (LAI *et al.*, 2012a; XIAO, J. *et al.*, 2010b; XIAO, Q. *et al.*, 2013b), e nenhuma pesquisa foi conduzida sobre a formação do complexo HSA - CdTe@TGA. Apesar dos esforços científicos, não há consenso sobre a principal força motriz por trás da formação desses complexos (BAIMANOV; CAI; CHEN, 2019). E como há uma variedade muito ampla de PQ e cada tipo de PQ tem suas próprias propriedades físicas e químicas (incluindo tamanho, carga, funcionalização de superfície e estabilidade), o mecanismo de interação PQ-proteína torna-se muito específico e mais estudos são necessários para investigar os efeitos biológicos dos PQs.

Portanto, para determinar a estabilidade e a força motriz para a formação dos complexos termodinamicamente estáveis de HSA-CdTe@MPA e HSA-CdTe@TGA, a constante de dissociação de equilíbrio (K_D), mudança de energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), variação de entalpia padrão (ΔH°), e variação de entropia padrão ($T\Delta S^{\circ}$), também foram determinadas a partir dos dados de SPR. Como é bem conhecido, os valores de K_D de proteína-ligante podem ser calculados a partir dos valores de k_a e k_d (equação 27). Como $K_D = 1/K_b$, onde K_b é a

constante de ligação de equilíbrio, os valores de ΔG° podem ser facilmente determinados usando a equação 28 (REZENDE *et al.*, 2020).

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (27)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (28)$$

Onde R é a constante universal dos gases (8.314 J/mol K), e T é a temperatura em K.

Os valores de ΔH° foram obtidos a partir da abordagem linear van't Hoff (Equação 29 e Figura Apêndice E), enquanto os valores de $T\Delta S^\circ$ foram calculados usando a equação termodinâmica fundamental (equação 30). Os valores de K_D , ΔG° , ΔH° e $T\Delta S^\circ$ são apresentados na Tabela 7.

$$\ln \left(\frac{K_b(T_2)}{K_b(T_1)} \right) = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (29)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (30)$$

Tabela 7 - Valores de K_D , ΔG° , ΔH° e $T\Delta S^\circ$ para os complexos termodinamicamente estáveis de HSA–CdTe@MPA e HSA–CdTe@TGA.

HSA–CdTe@MPA				
T	K_D	ΔH°	ΔG°	$T\Delta S^\circ$
K	10^{-8} M		kJ mol^{-1}	
285,15	$1,26 \pm 0,06$	$-11,83 \pm 0,67$	$-43,13 \pm 2,13$	$31,29 \pm 1,62$
289,15	$1,37 \pm 0,08$		$-43,53 \pm 2,15$	$31,70 \pm 1,03$
293,15	$1,47 \pm 0,07$		$-43,95 \pm 2,10$	$32,12 \pm 1,33$
297,15	$1,55 \pm 0,06$		$-44,42 \pm 2,07$	$32,59 \pm 1,55$
298,15	$1,57 \pm 0,09$		$-44,55 \pm 2,03$	$32,72 \pm 1,23$
301,15	$1,65 \pm 0,08$		$-44,86 \pm 2,13$	$33,03 \pm 1,02$
HSA–CdTe@TGA				
T	K_D	ΔH°	ΔG°	$T\Delta S^\circ$
K	10^{-8} M		kJ mol^{-1}	
285,15	$2,11 \pm 0,12$	$34,31 \pm 1,73$	$-41,90 \pm 2,05$	$76,21 \pm 3,93$
289,15	$1,75 \pm 0,09$		$-42,93 \pm 2,43$	$77,25 \pm 3,74$
293,15	$1,40 \pm 0,07$		$-44,08 \pm 2,71$	$78,39 \pm 4,01$
297,15	$1,21 \pm 0,07$		$-45,04 \pm 3,03$	$79,36 \pm 3,77$
298,15	$1,10 \pm 0,06$		$-45,42 \pm 1,97$	$79,73 \pm 2,03$
301,15	$0,98 \pm 0,04$		$-46,16 \pm 1,21$	$80,47 \pm 2,12$

Fonte: Da autora.

Legenda: Complexos de HSA–CdTe@MPA e HSA–CdTe@TGA termodinamicamente estáveis em diferentes temperaturas (T) e pH 7,4.

Para todas as temperaturas investigadas, os valores de K_D para a interação com ambos os PQs foram da ordem de magnitude de 10^{-8} M, e os valores de ΔG° foram negativos, indicando que os complexos formados eram estáveis (LELIS *et al.*, 2017) e sua estabilidade era quase independente da temperatura e da molécula funcionalizante do PQ. No entanto, alterar MPA para TGA na superfície das nanopartículas teve um efeito notável nos valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$. A formação do complexo $[\text{HSA} - \text{CdTe@MPA}]^\circ$ foi exotérmica ($\Delta H^\circ = -11,83 \text{ kJ mol}^{-1}$) e entropicamente favorável ($31,29 \leq T\Delta S^\circ \leq 33,03 \text{ kJ mol}^{-1}$), enquanto o $[\text{HSA} - \text{CdTe@TGA}]^\circ$ foi endotérmica ($\Delta H^\circ = 34,31 \text{ kJ mol}^{-1}$) e conduzida entropicamente ($76,21 \leq T\Delta S^\circ \leq 80,47 \text{ kJ mol}^{-1}$).

A formação de $[\text{HSA} - \text{ODs}]^\circ$ envolveu a dessolvatação das partículas interagem, a aproximação das proteínas e nanopartículas e, finalmente, o estabelecimento de interações covalentes não específicas. Portanto, como MPA e TGA são quimicamente semelhantes, a diferença entre os valores de ΔH° , bem como os valores de $T\Delta S^\circ$, foi devido às diferentes

densidades de cobertura de superfície dos PQs, que estavam diretamente relacionadas ao número e natureza dos sítios de ligação disponíveis para a interação HSA-PQ. Como o CdTe@MPA tem mais grupos carboxílicos e menos sítios metálicos disponíveis, mais energia foi liberada na interação do grupo HSA-carboxílico e menos energia foi absorvida para a dessolvatação dos sítios metálicos em comparação com a formação [HSA – CdTe@TGA]^o. Os valores positivos de ΔH° para a interação HSA-CdTe@TGA foram devido à cobertura da superfície metálica hidrofóbica do PQ ser relativamente alta. Não obstante, o alto ganho de entropia da interação HSA-CdTe@TGA surgiu da liberação de H₂O e a perda de entropia rotacional proveniente das ligações de hidrogênio orientadas nos sítios carboxílicos (MOTEVALLIAN *et al.*, 2020).

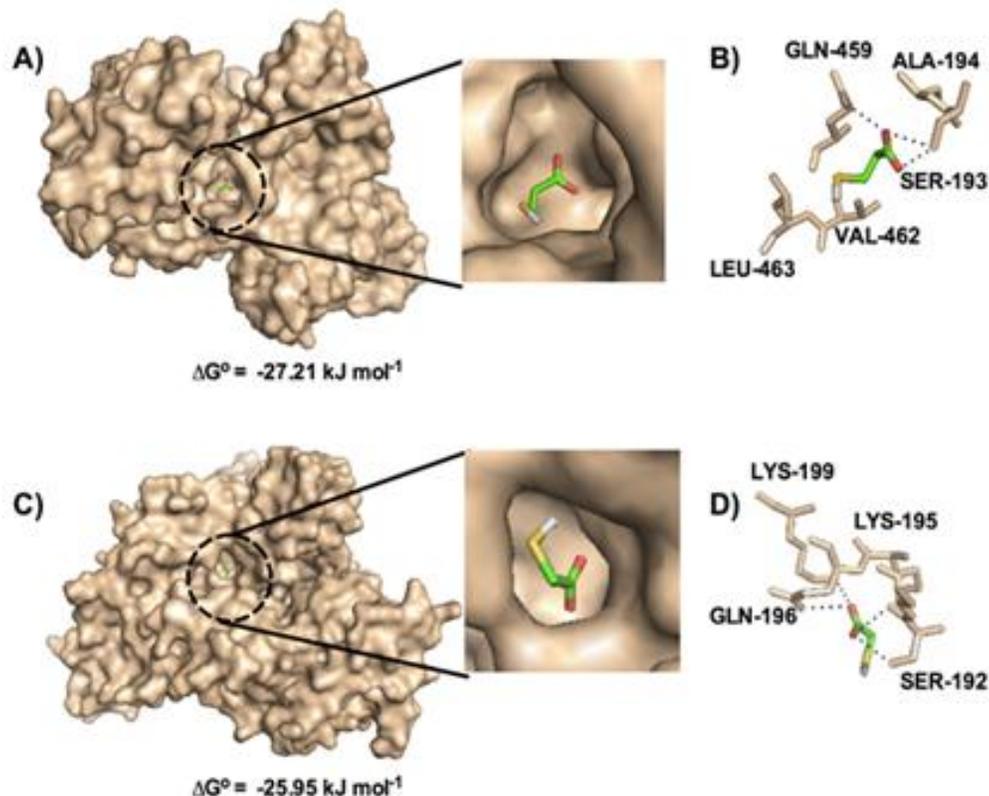
Até onde sabemos, a termodinâmica das interações entre HSA e CdTe@TGA não foi investigada. Xiao e colaboradores investigaram a interação entre HSA e PQs capeados com MPA (3,1 nm), através de espectroscopia de fluorescência em pH 7,4 em 298 K, e encontrou K_D ($8,03 \times 10^{-8}$ M), ΔG° ($-40,51$ kJ mol⁻¹), ΔH° ($-15,03$ kJ mol⁻¹), e $T\Delta S^\circ$ ($25,47$ kJ mol⁻¹) comparáveis aos obtidos neste trabalho (XIAO, Q. *et al.*, 2013b). A similaridade entre os resultados obtidos por SPR e espectroscopia de fluorescência mostrou que a interação entre HSA e PQs capeados por MPA ocorreu principalmente nos sítios de ligação próximos aos resíduos de triptofano da proteína. Também indicou que, embora os experimentos de SPR tenham sido realizados com a proteína imobilizada em um chip sensor, o que muitas vezes atrai críticas quanto à confiabilidade dos dados, essa técnica é adequada para o estudo de tais sistemas.

5.2.2.4 Docking molecular de interação de HSA com os ligantes MPA e TGA

Para avaliar como se daria a interação entre os ligantes e a proteína, inicialmente previu-se que os ligantes de superfície MPA e TGA se ligam a diferentes locais da HSA (Figura 33). Esta previsão da interação dos ligantes com a cavidade na superfície da proteína, sugere que esses modos de interação também podem ser compatíveis quando os ligantes estão conectados ao PQ de CdTe. No melhor modelo de docking, o sítio de ligação do MPA é composto por aminoácidos não polares (ALA, LEU e VAL) e polares (GLN e SER) e a interação é estabilizada por três contatos polares e interações hidrofóbicas. Por outro lado, o sítio de TGA tem apenas aminoácidos polares com estabilização de ligação por quatro contatos polares. As

características dos diferentes sítios de proteína também estão de acordo com a menor energia de dessolvatação observada para CdTe@MPA do que CdTe@TGA, anteriormante.

Figura 33 - Análise de docking molecular da interação HSA-MPA e HSA-TGA.



Fonte: Da autora.

Legenda: O melhor modo de ligação de HSA (superfície bege) e MPA (A) ou TGA (C). Aminoácidos HSA na interface de interação com MPA (B) ou TGA (D).

Os valores de ΔG° obtidos para ambos os ligantes foram menores que os determinados experimentalmente, e embora fossem aproximadamente iguais, para TGA foram maiores que para MPA, de acordo com os valores medidos. A diferença entre o valor de ΔG° obtido por docking molecular e experimental sugere que o CdTe favorece a estabilização da interação do ligante com a proteína. De fato, o valor experimental de ΔG° é compatível com a interação de múltiplas moléculas de ligante com a proteína que pode ser direcionada pelo CdTe funcionalizado. Em ambos os casos, os dados experimentais são compatíveis com a interação de duas moléculas de ligantes no melhor e no segundo melhor sítio previsto.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo de sintetizar AuNPs e desenvolver um método baseado em voltametria cíclica para avaliar o mecanismo de interação entre AuNPs com a membrana artificial suportada, foram alcançados. A membrana suportada, composta por L- α -fostatidilcolina e colesterol, se formou facilmente sobre o eletrodo de platina e se mostrou estável sobre as condições experimentais trabalhadas. Além disso pode-se verificar que AuNPs de diferentes tamanhos induzem a diferentes respostas na integridade da membrana suportada, NPs de 4 nm praticamente não rompem a membrana diferente de NPs de 15 e 40 nm. AuNPs de 60 nm inicialmente não romperam a membrana, mas a partir de tempos superiores de 80 minutos após contato da NP com a s-BLM, pode-se observar picos de oxidação e redução altos, indicando que solução de ferrocianeto chegaram à superfície do eletrodo de Pt. Outro estudo, em que a concentração de NPs de 15 nm foi reduzida à metade, evidenciando que o efeito observado pode ser também altamente dependente do número de partículas presentes na dispersão coloidal de NP.

Investigações cinéticas e termodinâmicas da interação entre HSA e dois PQs (CdTe@MPA e CdTe@TGA) foram realizadas para entender como essas nanopartículas formam complexos com proteínas plasmáticas antes de sua entrega no organismo. Independente da molécula funcionalizante, a HSA interagiu com os PQs de CdTe com alta afinidade, sendo o processo de ligação reversível e sem grandes alterações estruturais na proteína. Além disso, essa interação ocorreu em dois sítios de ligação PQ diferentes: os grupos carboxílicos das moléculas funcionalizantes e as superfícies metálicas sem os ligantes. Estudos de docking molecular para a ligação de MPA e/ou TGA à HSA mostraram que os complexos formados são menos estáveis do que os complexos com os PQs funcionalizados, o que mostra o papel do sítio metálico na estabilização do $[HSA - CdTe]^{\circ}$. No entanto, as forças motrizes responsáveis pela formação de $[HSA - CdTe@MPA]^{\circ}$ e $[HSA - CdTe@TGA]^{\circ}$ foram diferentes. Enquanto a interação de HSA com CdTe@MPA foi entálpica e entropicamente favorável, a formação de $[HSA - CdTe@TGA]^{\circ}$ foi apenas conduzida entropicamente. Além disso, a associação de nanopartículas livres de HSA e PQ ou dissociação de $[HSA - PQs]^{\circ}$ ocorreu através da formação de $[HSA - PQs]^{\ddagger}$. Para ambas as moléculas funcionalizantes, a formação do complexo $[HSA - PQs]^{\ddagger}$ pela associação das moléculas HSA e PQ livres ocorreu mais rapidamente do que a dissociação dos $[HSA - PQs]^{\circ}$. Porém, para o processo de associação, os valores de E^{\ddagger} , ΔH^{\ddagger} e $T\Delta S^{\ddagger}$ foram maiores para a interação com CdTe@TGA do que com

CdTe@MPA, enquanto para a etapa de dissociação foi obtido o resultado oposto. As diferenças nos parâmetros termodinâmicos e cinéticos quando a molécula de MPA foi substituída por TGA mostraram que os parâmetros energéticos de formação de $[HSA - PQs]^{\circ}$ e $[HSA - PQs]^{\dagger}$ foram altamente dependentes da natureza dos locais de superfície do PQs. Esses resultados podem ser muito úteis para futuras aplicações biomédicas dessas nanopartículas, visto que a estabilidade e o comportamento cinético dos complexos HSA-PQ contribuem para a resposta farmacológica *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N. A. et al. The Role of Functional Nanomaterials for Wastewater Remediation. **Royal Society of Chemistry**, Reino Unido, p. 1–28, set. 2021.
- ALAFEEF, M. et al. RNA-extraction-free nano-amplified colorimetric test for point-of-care clinical diagnosis of COVID-19. **Nature Protocols**, Reino Unido, v. 16, n. 6, p. 3141-3162, jun. 2021.
- ALMEIDA, A. B. **Predição de Estrutura Terciária de Proteínas com Técnicas Multiobjetivo no Algoritmo de Monte Carlo**. 2016. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2016.
- AMEH, E. S. A review of basic crystallography and x-ray diffraction applications. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, Reino Unido, v. 105, n. 7–8, p. 3289–3302, dez. 2019.
- ANTONIO AGUILAR–TAPIA; ZANELLA, R. Vista de Las nanopartículas bimetálicas y algunas de sus aplicaciones | Mundo Nano. **Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología**, México, p. 72-92, nov. 2021.
- ARAÚJO, E. A. et al. Modification of stainless steel surface hydrophobicity by silver nanoparticles: Strategies to prevent bacterial adhesion in the food processing. **Journal of Adhesion Science and Technology**, Reino Unido, v. 27, p. 2686–2695, 2013.
- ASAKA, K.; TI TIEN, H.; OTTOVA, A. Voltammetric study of charge transfer across supported bilayer lipid membranes (s-BLMs). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Estados Unidos, v. 40, n. 1–2, p. 27–37, 1999.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. A review on impedimetric biosensors. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 44, n. 1, p. 248–262, 2 jan. 2016.
- BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, Bangladesh, v. 12, n. 2, p. 115–118, 2017.
- BAILEY, C. M. *et al.* Size dependence of gold nanoparticle interactions with a supported lipid bilayer: A QCM-D study. **Biophysical Chemistry**, Estados Unidos, v. 203–204, p. 51–61, 31 maio 2015.
- BAIMANOV, D.; CAI, R.; CHEN, C. Understanding the Chemical Nature of Nanoparticle–Protein.pdf. **Bioconjugate Chemistry**, Estados Unidos, v. 30, p. 1923–1937, 2019.
- BANSAL, S. A. et al. Role of gold nanoparticles in advanced biomedical applications. **Nanoscale Advances**, Estados Unidos, v. 2, p. 3764-3787, 14 jul. 2020.
- BARBOSA, A. F. *et al.* Action of Chicory Fructooligosaccharides on Biomimetic Membranes. **International Journal of Electrochemistry**, Estados Unidos, v. 2014, p. 1–8,

19 out. 2014.

BARBOSA, A. F. *et al.* Kefiran can disrupt the cell membrane through induced pore formation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 653, n. 1–2, p. 61–66, 01 mar. 2011.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, Estados Unidos, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, set. 2007.

BEHZADI, S. *et al.* Determination of nanoparticles using UV-Vis spectra. **Nanoscale**, Estados Unidos, v. 7, n. 12, p. 5134–5139, mar. 2015.

BENMORE, C. J. A Review of High-Energy X-Ray Diffraction from Glasses and Liquids. **ISRN Materials Science**, Estados Unidos, v. 2012, p. 1–19, nov. 2012.

BERANEK, R. (Photo)electrochemical methods for the determination of the band edge positions of TiO₂-based nanomaterials. **Advances in Physical Chemistry**, Washington, v. 2011, p. 1-20, 2011.

BHARDWAJ, H. *et al.* Graphene quantum dots-based nano-biointerface platform for food toxin detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 410, n. 28, p. 7313–7323, 2018.

BHAT, A. *et al.* Effects of gold nanoparticles on lipid packing and membrane pore formation. **Applied Physics Letters**, Paris, v. 109, n. 26, 2016.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, Estados Unidos, v. 235, p. 337-351, ago. 2016.

BONDAR, A. N. Introduction: Biomembrane Structure, Dynamics, and Reactions. **Chemical Reviews**, Estados Unidos, v. 119, n. 9, p. 5535-5536, maio 2019.

BONILLA, C. A. M.; KOUZNETSOV, V. V. “Green” Quantum Dots: Basics, Green Synthesis, and Nanotechnological Applications. **Green Nanotechnology - Overview and Further Prospects**, Estados Unidos, v. 2016, p. 1 – 15, nov. 2016.

BRANDA, F. *et al.* Effect of exposure to growth media on size and surface charge of silica based Stöber nanoparticles: a DLS and ζ -potential study. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, Estados Unidos, v. 73, n. 1, p. 54–61, jan. 2015.

BUHR, E. *et al.* Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy in transmission mode. **Measurement Science and Technology**, Estados Unidos, v. 20, n. 8, p. 084025, jun. 2009.

BURLEY, S. K. *et al.* RCSB Protein Data Bank: Powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. **Nucleic Acids Research**, Estados Unidos, v. 49, n. 1, p. 437–451, 2021.

CAGNIN, R. L. **Método de Wang-Landau para sequenciamento de aminoácidos em**

estrutura nativa de proteínas em modelos de rede. 2015. 79f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2010.

CAI, H.; YAO, P. Gold nanoparticles with different amino acid surfaces: Serum albumin adsorption, intracellular uptake and cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Estados Unidos, v. 123, p. 900–906, nov. 2014.

CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: An updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 396, n. 1, p. 241–259, 2010.

CANEPA, E. *et al.* Non-disruptive uptake of anionic and cationic gold nanoparticles in neutral zwitterionic membranes. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 11, n. 1, p. 1256, 1 dez. 2021.

CARACCILO, G.; FAROKHZAD, O. C.; MAHMOUDI, M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona. **Trends in Biotechnology**, Estados Unidos, v. 5, n. 3, p. 257-264, mar. 2017.

CARVALHO, R. M. DE; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR: Uma nova ferramenta para biossensores. **Química Nova**, Brasil, v. 26, n. 1, p. 97–104, jan. 2003.

CEDERVALL, T. *et al.* Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos, v. 104, n. 7, p. 2050–2055, fev. 2007.

CEDERVALL, T. *et al.* Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Estados Unidos, v. 104, n. 7, p. 2050-2055, fev. 2007.

CHAKRABORTY, S. *et al.* Phospholipid Bilayer Softening Due to Hydrophobic Gold Nanoparticle Inclusions. **Langmuir**, Estados Unidos, v. 34, n. 44, p. 13416–13425, nov. 2018.

CHEN, A. A. *et al.* Quantum dots to monitor RNAi delivery and improve gene silencing. **Nucleic Acids Research**, Estados Unidos, v. 33, n. 22, p. 190-190, dez. 2005.

CHEN, R. *et al.* Intelligent testing strategy and analytical techniques for the safety assessment of nanomaterials. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 410, n. 24, p. 6051–6067, set. 2018.

CHEN, X. *et al.* Coherency strain effects on the optical response of core/shell heteronanostructures. **Nano Letters**, Estados Unidos, v. 3, n. 6, p. 799–803, jun. 2003.

CHITHRANI, B. D.; GHAZANI, A. A.; CHAN, W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Letters**, Estados Unidos, v. 6, n. 4, p. 662–668, abr. 2006.

COELHO, Y. L. *et al.* Exploring the interaction between lactoferrin and CdTe quantum dots:

Energetic and molecular dynamic study. **Journal of Molecular Liquids**, Estados Unidos, v. 356, p. 119005, 15 jun. 2022.

COELHO, Y. L. *et al.* Lactoferrin-phenothiazine dye interactions : Thermodynamic and kinetic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, Estados Unidos, v. 136, p. 559–569, 2019.

CONTINI, C. *et al.* Nanoparticle–membrane interactions. **Journal of Experimental Nanoscience**, Reino Unido, v. 13, n. 1, p. 62–81, 2018.

CONTINI, C. *et al.* Size dependency of gold nanoparticles interacting with model membranes. **Communications Chemistry**, Estados Unidos, v. 3, n. 1, 2020.

CRAWFORD, B. M. *et al.* Photothermal ablation of inflammatory breast cancer tumor emboli using plasmonic gold nanostars. **International Journal of Nanomedicine**, Estados Unidos, v. 12, p. 6259–6272, 26 ago. 2017.

CUI, M. L. *et al.* Selective determination of cysteine using BSA-stabilized gold nanoclusters with red emission. **Analyst**, Reino Unido, v. 137, n. 22, p. 5346–5351, nov. 2012.

DA ROSA, L. *et al.* Improving Photoluminescence Quantum Yield of CdTe Quantum Dots Using a Binary Solvent (Water + Glycerin) in the One-Pot Approach Synthesis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 32, n. 4, p. 1–9, 2021.

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Methods in Molecular Biology**, Estados Unidos, v. 1263, p. 243–250, 2015.

DE BARROS, H. *et al.* Physicochemical Study of the Interaction between Gold Nanoparticles and Lipase from *Candida* sp. (CALB): Insights into the Nano-Bio Interface. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 30, n. 10, p. 2231–2242, out. 2019.

DE OLIVEIRA, J. F. A. *et al.* Defeating Bacterial Resistance and Preventing Mammalian Cells Toxicity Through Rational Design of Antibiotic-Functionalized Nanoparticles. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

DE PAULA, H. M. C. *et al.* Kinetics and thermodynamics of bovine serum albumin interactions with Congo red dye. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Estados Unidos, v. 159, p. 737–742, 2017.

DEAMER, D. W.; BRAMHALL, J. Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. **Chemistry and Physics of Lipids**, Estados Unidos, v. 40, n. 2–4, p. 167–188, 1986.

DOANE, T. L. *et al.* Nanoparticle ζ -potentials. **Accounts of Chemical Research**, Estados Unidos, v. 45, n. 3, p. 317–326, mar. 2012.

DU, L. *et al.* A study on the interaction between ibuprofen and bilayer lipid membrane. **Electrochimica Acta**, Estados Unidos, v. 51, n. 26, p. 5754–5760, ago. 2006.

DU, X. *et al.* Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, Estados Unidos, v. 17, n.2, p. 144, jan. 2016.

DUYGU, D. *et al.* REVIEW Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies. **Journal of Science**, Estados Unidos, v. 22, n. 3, p. 117-12, 2009.

DYKMAN, L.; KHLEBTSOV, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. **Chemical Society Reviews**, Estados Unidos, v. 41, n. 6, p. 2256–2282, fev. 2012.

EKIMOV, A. I.; EFROS, A. L.; ONUSHCHENKO, A. A. Quantum size effect in semiconductor microcrystals. **Solid State Communications**, Estados Unidos, v. 56, n. 11, p. 921–924, 1985.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, Reino Unido, v. 184, p. 537–556, 2018.

ELGRISHI, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, Estados Unidos, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

ELGRISHI, N. *et al.* Reaction Pathways of Hydrogen-Evolving Electrocatalysts: Electrochemical and Spectroscopic Studies of Proton-Coupled Electron Transfer Processes. **ACS Catalysis**, Estados Unidos, v. 6, n. 6, p. 3644–3659, 2016.

ENGELMAN, D. M. Membranes are more mosaic than fluid. **Nature**, Estados Unidos, v. 438, p. 578–580, dez. 2005.

ESPINOSA, A. *et al.* Cancer Cell Internalization of Gold Nanostars Impacts Their Photothermal Efficiency In Vitro and In Vivo: Toward a Plasmonic Thermal Fingerprint in Tumoral Environment. **Advanced Healthcare Materials**, Estados Unidos, v. 5, n. 9, p. 1040–1048, maio 2016.

FAGHIHZADEH, F. *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy to assess molecular-level changes in microorganisms exposed to nanoparticles. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, Estados Unidos, v. 1, n. 1, p. 1–16, dez. 2016.

FAN, J.; CHENG, Y.; SUN, M. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. **Chemical Record**, Estados Unidos, v. 20, n. 12, p. 1474-1504, set. 2020.

FILHO, H. D. D. F.; CARVALHO, G. A. DE. Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de Difractometria de Raios-X. **Estação Científica UNIFAP**, Brasil, v. 3, n. 1, p. 31–45, 2013.

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**, Estados Unidos, v. 10, n. 1, p. 221-235, dez. 2015.

FRATODDI, I. *et al.* How toxic are gold nanoparticles? The state-of-the-art. **Nano Research**, Estados Unidos, v. 8, n. 6, p. 1771–1799, 2015.

- FU, Y. *et al.* Concentration determination of gold nanoparticles by flame atomic absorption spectrophotometry. **Acta Geochimica**, Estados Unidos, v. 40, n. 4, p. 498–506, 1 ago. 2021.
- GAO, J. *et al.* Aromaticity/Bulkiness of Surface Ligands to Promote the Interaction of Anionic Amphiphilic Gold Nanoparticles with Lipid Bilayers. **Langmuir**, Estados Unidos, v. 32, n. 6, p. 1601–1610, 16 fev. 2016.
- GAO, Q. *et al.* Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 9, abr. 2021.
- GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, Estados Unidos, v. 94, n. 1–2, p. 57–63, nov. 1986.
- GHAFFARY, S. M. *et al.* Simultaneous Gene Delivery and Tracking through Preparation of Photo-Luminescent Nanoparticles Based on Graphene Quantum Dots and Chimeric Peptides. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 7, n. 1, p. 9552, 2017.
- GIEPMANS, B. N. G. *et al.* Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots. **Nature Methods**, Estados Unidos, v. 2, n. 10, p. 743–749, 2005.
- GODOI CONTESSOTO, V. DE *et al.* Introdução ao problema de enovelamento de proteínas: uma abordagem utilizando modelos computacionais simplificados. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, Brasil, v. 40, n. 4, 2018.
- GOLDMAN, E. R. *et al.* Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents. **Analytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 76, n. 3, p. 684–688, fev. 2004.
- GONZALEZ-ARAVENA, A. C. *et al.* Tapping into cyanobacteria electron transfer for higher exoelectrogenic activity by imposing iron limited growth. **RSC Advances**, Estados Unidos, v. 8, n. 36, p. 20263–20274, 2018.
- GREEN, R. J. *et al.* Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. **Biomaterials**, Estados Unidos, v. 21, n. 18, p. 1823–1835, set. 2000.
- GRUPI, A. *et al.* Interfacing the Cell with “Biomimetic Membrane Proteins”. **Small**, v. 15, n. 52, p. 1903–2006, dez. 2019.
- GRZELCZAK, M. P. *et al.* Design of artificial membrane transporters from gold nanoparticles with controllable hydrophobicity. **Faraday Discussions**, Estados Unidos, v. 191, p. 495–510, 2016.
- HAASE, M.; WELLER, H.; HENGLEIN, A. Photochemistry and radiation chemistry of colloidal semiconductors 23. Electron storage on zinc oxide particles and size quantization. **Journal of physical chemistry**, Estados Unidos, v. 92, n. 2, p. 482–487, 1988.
- HAES, A. J. *et al.* Plasmonic materials for surface-enhanced sensing and spectroscopy. **MRS Bulletin**, Estados Unidos, v. 30, p. 368–375, jan. 2011.
- HAHN, M. A.; KENG, P. C.; KRAUSS, T. D. Flow Cytometric Analysis To Detect

- Pathogens in Bacterial Cell Mixtures Using Semiconductor Quantum Dots. **Analytical Chemistry**, Estados Unidos , v. 80, n. 3, p. 864–872, fev. 2008.
- HAHN, M. A.; TABB, J. S.; KRAUSS, T. D. Detection of Single Bacterial Pathogens with Semiconductor Quantum Dots. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 15, p. 4861–4869, ago. 2005.
- HAISS, W. *et al.* Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. **Analytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 1 jun. 2007.
- HAN, X. *et al.* Applications of nanoparticles in biomedical imaging. **Nanoscale**, Estados Unidos , v. 11, n. 3, p. 799-819, jan. 2019.
- HARTWELL, L. H. *et al.* From molecular to modular cell biology. **Nature**, Estados Unidos , v. 402, n. 6761 SUPPL. 1, p. 47–52, dez. 1999.
- HE, X. C. *et al.* Advances in studies of nanoparticle-biomembrane interactions. **Nanomedicine**, Estados Unidos , v. 10, n. 1, p. 121-41, jan. 2015.
- HEERKLOTZ, H. Interactions of surfactants with lipid membranes. **Quarterly Reviews of Biophysics**, Estados Unidos , v. 41, n. 3, p. 205-64, nov. 2008.
- HEINZ, H. *et al.* Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications. **Surface Science Reports**, Estados Unidos, v. 72, n. 1, p. 1–58, 2017.
- HONEYCHURCH, K. C. Review of electroanalytical-based approaches for the determination of benzodiazepines. **Biosensors**, Estados Unidos, v. 9, n. 4, 130, set. 2019.
- HOWARTH, M. *et al.* Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos, v. 102, n. 21, p. 7583–7588, mai. 2005.
- HU, S. *et al.* Surface plasmon resonance enhancement of photoluminescence intensity and bioimaging application of gold nanorod@CdSe/ZnS quantum dots. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, Estados Unidos, v. 10, n. 1, p. 22–31, jan 2019.
- HU, X. *et al.* Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, Estados Unidos, v. 8, p. 990, ago. 2020.
- HU, Y. *et al.* Interactions between CdTe quantum dots and plasma proteins: Kinetics, thermodynamics and molecular structure changes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Estados Unidos, v. 189, p. 110-881, fev. 2020.
- HUANG, X. *et al.* Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, Estados Unidos, v. 128, n. 6, p. 2115–2120, 15 fev. 2006.
- IANNAZZO, D. *et al.* Graphene quantum dots for cancer targeted drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Estados Unidos, v. 518, n. 1, p. 185–192, 2017.

- IDOWU, M.; LAMPRECHT, E.; NYOKONG, T. Interaction of water-soluble thiol capped CdTe quantum dots and bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Estados Unidos, v. 198, n. 1, p. 7–12, 2008.
- IELO, I. *et al.* Synthesis, chemical–physical characterization, and biomedical applications of functional gold nanoparticles: A review. **Molecules**, Estados Unidos, v. 26, n. 19, 2021.
- IQBAL, M. *et al.* Preparation of gold nanoparticles and determination of their particles size via different methods. **Materials Research Bulletin**, Estados Unidos, v. 79, p. 97–104, 2016.
- JAFARI, M. *et al.* The Molecular Basis of the Sodium Dodecyl Sulfate Effect on Human Ubiquitin Structure: A Molecular Dynamics Simulation Study. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 8, n. 1, p. 1–15, dez. 2018.
- JAMIESON, T. *et al.* Biological applications of quantum dots. **Biomaterials**, Estados Unidos, v. 28, n. 31, p. 4717–4732, 2007.
- JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Seeding growth for size control of 5–40 nm diameter gold nanoparticles. **Langmuir**, Estados Unidos, v. 17, n. 22, p. 6782–6786, 2001.
- JENDRZEJEWSKA, I. Application of X-Ray Powder Diffraction for Analysis of Selected Dietary Supplements Containing Magnesium and Calcium. **Frontiers in Chemistry**, Estados Unidos, v. 8, p. 672, set. 2020.
- JEON, H. BIN; TSALU, P. V.; HA, J. W. Shape Effect on the Refractive Index Sensitivity at Localized Surface Plasmon Resonance Inflection Points of Single Gold Nanocubes with Vertices. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 9, n. 1, p. 1–8, dez. 2019.
- Jl, X. *et al.* Ligand bonding and dynamics on colloidal nanocrystals at room temperature: The case of alkylamines on CdSe nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**, Estados Unidos, v. 130, n. 17, p. 5726–5735, abr. 2008.
- JIN, W.; MADURAVEERAN, G. Nanomaterial-based environmental sensing platforms using state-of-the-art electroanalytical strategies. **Journal of Analytical Science and Technology**, Estados Unidos, v. 9, n. 18, dez. 2018.
- JO, I.; KANG, J. W.; KIM, K.-S. Synthesis of Cadmium Telluride Nanoparticles Using Thioglycolic Acid, Thioglycerol, and L-Cysteine. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Estados Unidos, v. 21, n. 7, p. 4073–4076, mar. 2021.
- JOGLEKAR, S. S. *et al.* The interactions between CdTe quantum dots and proteins: Understanding nano-bio interface. **AIMS Materials Science**, Estados Unidos, v. 4, n. 1, p. 209–222, 2017.
- JOGLEKAR, S. S. *et al.* The interactions between CdTe quantum dots and proteins: Understanding nano-bio interface. **AIMS Materials Science**, Estados Unidos, v. 4, n. 1, p. 209–222, 2017.
- JOHANNSMEIERS, S. *et al.* Gold nanoparticle-mediated laser stimulation induces a complex

stress response in neuronal cells. *Scientific Reports*, Estados Unidos, v. 8, n. 1, p. 3–14, 2018.

KIRSCH, S. A.; BÖCKMANN, R. A. Membrane pore formation in atomistic and coarse-grained simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, Estados Unidos, v. 1858, n. 10, p. 2266–2277, 2016.

KOPEC, K. *et al.* Comparison of α -Helix and β -Sheet Structure Adaptation to a Quantum Dot Geometry: Toward the Identification of an Optimal Motif for a Protein Nanoparticle Cover. *ACS Omega*, Estados Unidos, v. 4, n. 8, p. 13086–13099, ago 2019.

KOPPEL, D. E. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: The method of cumulants. *The Journal of Chemical Physics*, Estados Unidos, v. 57, n. 11, p. 4814–4820, dez. 1972..

KRISHNAVENI, P.; GANESH, V. Electron transfer studies of a conventional redox probe in human sweat and saliva bio-mimicking conditions. *Scientific Reports*, Estados Unidos, v. 11, n. 1, p. 7663, dez. 2021.

KRIVANEK, O. L. *et al.* Atom-by-atom structural and chemical analysis by annular dark-field electron microscopy. *Nature*, Estados Unidos, v. 464, n. 7288, p. 571–574, 25 mar. 2010.

KUMAR, P. Semiconductor (CdSe and CdTe) quantum dot: Synthesis, properties and applications. *Materials Today: Proceedings*, Estados Unidos, v. 51, n. 2, p. 900-904, 2022.

KUNDROTAS, G. *et al.* Uptake and distribution of carboxylated quantum dots in human mesenchymal stem cells: Cell growing density matters. *Journal of Nanobiotechnology*, Estados Unidos, v. 17, n. 1, p. 39, 13 mar. 2019.

LAI, L. *et al.* Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Spectroscopic studies on the interactions between CdTe quantum dots coated with different ligands and human serum albumin. *Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Estados Unidos, v. 97, p. 366–376, 2012.

LAI, L. *et al.* Spectroscopic studies on the interactions between CdTe quantum dots coated with different ligands and human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Estados Unidos, v. 97, p. 366–376, 2012.

LEE, K. J. *et al.* Electrochemical and spectroscopic methods for evaluating molecular electrocatalysts. *Nature Reviews Chemistry*, Estados Unidos, v. 1, n. 39, maio 2017.

LEE, K. X. *et al.* Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, Estados Unidos, v. 15, p. 275–300, jan. 2020.

LEE, P.; WU, X. Review: Modifications of Human Serum Albumin and their Binding Effect. *Current Pharmaceutical Design*, Estados Unidos, v.21, n. 14, p. 1862–1865, abr 2015.

LELIS, C. A. *et al.* Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. *Food Chemistry*, Estados Unidos, v. 217, p. 52–58, fev. 2017.

LI, H.; ZHAO, T.; SUN, Z. Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions. **Reviews in Analytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 37, n. 1, p. 1–23, 2018.

LIANG, J.; CHENG, Y.; HAN, H. Study on the interaction between bovine serum albumin and CdTe quantum dots with spectroscopic techniques. **Journal of Molecular Structure**, Estados Unidos, v. 892, n. 1, p. 116–120, 2008.

LIMA, M. B. et al. Using webcam, CdTe quantum dots and flow-batch system for automatic spectrofluorimetric determination of N-Acetyl-L-cysteine in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Estados Unidos, v. 25, n. 9, Sept 2014.

LIN, P. C. *et al.* Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, Estados Unidos, v. 32, n. 4, p. 711-726, ago. 2014.

LOMBARD, J. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. **Biology Direct**, Estados Unidos, v. 9, n. 32, 2014.

LÓPEZ-LORENTE, Á. I.; MIZAIKOFF, B. Recent advances on the characterization of nanoparticles using infrared spectroscopy. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 97-106, nov. 2016.

LOVRIĆ, J. *et al.* Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. **Chemistry and Biology**, Estados Unidos, v. 12, n. 11, p. 1227–1234, 2005.

LUZ, J. G. G. **Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de anticorpos anti-Trypanosoma cruzi por meio da espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície**. 2014. 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2014.

M. KADIM, A. Applications of Cadmium Telluride (CdTe) in Nanotechnology. **Nanomaterials - Toxicity, Human Health and Environment**, Estados Unidos, v.2018, p. 1 – 22, jun. 2019.

MA, N. *et al.* DNA-passivated CdS nanocrystals: Luminescence, bioimaging, and toxicity profiles. **Langmuir**, Estados Unidos, v. 23, n. 26, p. 12783–12787, dez. 2007.

MACIĄŻEK-JURCZYK, M. *et al.* Alteration of human serum albumin binding properties induced by modifications: A review. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Estados Unidos, v. 188, p. 675–683, 2018.

MAGAR, H. S.; HASSAN, R. Y. A.; MULCHANDANI, A. Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. **Sensors**, Estados Unidos, v. 21, n. 19, p. 6578, 2021.

MARIN, J. F. G. *et al.* Theranostics in nuclear medicine: Emerging and re-emerging integrated imaging and therapies in the era of precision oncology. **Radiographics**, Estados Unidos, v. 40, n. 6, p. 1715–1740, out. 2020.

MARONESI, R. N. **Nova técnica para a produção de pontos quânticos coloidais de CDs em meio puramente aquoso.** 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

MASSEY, M. *et al.* Mind your P's and Q's: The coming of age of semiconducting polymer dots and semiconductor quantum dots in biological applications. **Current Opinion in Biotechnology**, Estados Unidos, v. 34, p. 30–40, 2015.

MASSON, J. F. Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors. **Analyst**, Estados Unidos, v. 145, n. 11, p. 3776–3800, 2020.

MATEA, C. T. *et al.* Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. **International journal of nanomedicine**, Estados Unidos, v. 12, p. 5421–5431, jul. 2017.

MEDINTZ, I. L. *et al.* Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nature Materials**, Estados Unidos, v. 4, p. 435–446, jun. 2005.

MELBY, E. S. *et al.* Peripheral Membrane Proteins Facilitate Nanoparticle Binding at Lipid Bilayer Interfaces. **Langmuir**, Estados Unidos, v. 34, n. 36, p. 10793–10805, set. 2018.

MEZRAG, F.; BOUARISSA, N. Pseudopotential Study of CdTe Quantum Dots: Electronic and Optical Properties. **Materials Research**, Estados Unidos, v. 22, n. 3, maio 2019.

MICHALET, X. Quantum Dots for Live Cells, in vivo imaging, and diagnostics. **Science**, Estados Unidos, v. 307, n. 5709, p. 538–545, jan. 2005.

MINNES, R. *et al.* Using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infra-Red (ATR-FTIR) spectroscopy to distinguish between melanoma cells with a different metastatic potential. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 7, n. 1, p. 1–7, dez. 2017.

MONTIS, C. *et al.* Model lipid bilayers mimic non-specific interactions of gold nanoparticles with macrophage plasma membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, Estados Unidos, v. 516, p. 284–294, 2018.

MOREIRA, C. Membrana celular. **Revista de Ciência Elementar**, Brasil, v. 2, n. 2, p. 2–4, 2014.

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, Estados Unidos, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MOSQUERA, J. *et al.* Cellular Uptake of Gold Nanoparticles Triggered by Host-Guest Interactions. **Journal of the American Chemical Society**, Estados Unidos, v. 140, n. 13, p. 4469–4472, abr. 2018.

MOTEVALLIAN, M. *et al.* Mutual effects of protein corona formation on CdTe quantum dots. **Analytical Biochemistry**, Estados Unidos, v. 610, p. 113983, dez. 2020.

MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties.

Nanoscale, Estados Unidos, v. 10, p. 12871-12934, jul. 2018.

NALAWADE, P.; MUKHERJEE, T.; KAPOOR, S. High-yield synthesis of multispiked gold nanoparticles: Characterization and catalytic reactions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Estados Unidos, v. 396, n. 396, p. 336–340, fev. 2012.

NAM, J. *et al.* Lipid Reconstitution-Enabled Formation of Gold Nanoparticle Clusters for Mimetic Cellular Membrane. **Journal of Nanomaterials**, Estados Unidos, v. 2016, maio 2016.

NARESH, V.; LEE, N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors**, Estados Unidos, v. 21, n. 4, p. 1109, fev. 2021.

NAVYATHA, B.; NARA, S. Gold nanotheranostics: future emblem of cancer nanomedicine. **Nanobiomedicine**, Estados Unidos, v. 8, p. 18495435211053945, out. 2021.

NIENHAUS, K.; WANG, H.; NIENHAUS, G. U. Nanoparticles for biomedical applications: exploring and exploiting molecular interactions at the nano-bio interface. **Materials Today Advances**, Estados Unidos, v. 5, p. 100036, mar. 2020.

NIKOLOVSKA-COLESKA, Z. Studying protein-protein interactions using surface plasmon resonance. **Methods in Molecular Biology**, Estados Unidos, v. 1278, p. 109–138, 2015.

OLIVEIRA, G.; SCHNEEDORF, J. M. A Simple, Fast and Portable Method for Electrochemical Detection of Adenine Released by Ricin Enzymatic Activity. **Toxins**, Estados Unidos, v. 13, n. 4, 2021.

OLIVEIRA, J. P. *et al.* A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling. **Arabian Journal of Chemistry**, Estados Unidos, v. 13, n. 1, p. 216–226, 2020.

OTZEN, D. E. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, Estados Unidos, v. 1859, n. 4, p. 639-6491, abr. 2017.

OZKAN, S. A.; USLU, B. From mercury to nanosensors: Past, present and the future perspective of electrochemistry in pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Estados Unidos, v. 130, p. 126–140, 25 out. 2016.

PACHECO, W. F. *et al.* Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual Química**, Brasil, v. 5, n. 4, p. 516–537, ago. 2013.

PAN, Y.; BARTNECK, M.; JAHNEN-DECHENT, W. Cytotoxicity of gold nanoparticles. **Methods in Enzymology**, Estados Unidos, v. 509, p. 225–242, 2012.

PASHKOV, D. M. *et al.* Quantitative Analysis of the UV-Vis Spectra for Gold Nanoparticles Powered by Supervised Machine Learning. **Journal of Physical Chemistry C**, Estados Unidos, v. 125, n. 16, p. 8656–8666, abr. 2021.

- PELAZ, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. **ACS Nano**, Estados Unidos, v. 11, n. 3, p. 2313–2381, mar. 2017.
- PERNODET, N. *et al.* Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. **Small**, Estados Unidos, v. 2, n. 6, p. 766–773, jun. 2006.
- PETERSSON, G. A. Perspective on “the activated complex in chemical reactions”. **Theoretical Chemistry Accounts**, Estados Unidos, v. 103, n. 3–4, p. 190–195, 2000.
- PETROVIĆ, M.; CHELLAPPAN, V.; RAMAKRISHNA, S. Perovskites: Solar cells & engineering applications - materials and device developments. **Solar Energy**, Estados Unidos, v. 122, p. 678–699, dez. 2015.
- PHILLIPS, R. *et al.* Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. **Nature**, Estados Unidos, v. 4589, p. 379–385, maio 2009.
- PHOGAT, N.; KOHL, M.; UDDIN, I. Interaction of Nanoparticles With Biomolecules, Protein, Enzymes, and Its Applications. **Precision Medicine: Tools and Quantitative Approaches**, Estados Unidos, v. 2018, p. 253–276, 2018.
- PRADHAN, N. *et al.* Surface ligand dynamics in growth of nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**, Estados Unidos, v. 129, n. 30, p. 9500–9509, ago. 2007.
- PRIVALOV, P. L. Intermediate states in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, Estados Unidos, v. 258, n. 5, p. 707–25, maio 1996.
- PROBST, C. E. *et al.* Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Estados Unidos, v. 65, n. 5, p. 703–718, 2013.
- PROVENCHER, S. W. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. **Computer Physics Communications**, Estados Unidos, v. 27, n. 3, p. 229–242, 1 set. 1982.
- PYRZ, W. D.; BUTTREY, D. J. Particle size determination using TEM: A discussion of image acquisition and analysis for the novice microscopist. **Langmuir**, Estados Unidos, v. 24, n. 20, p. 11350–11360, out. 2008.
- QI, L.; GAO, X. Emerging application of quantum dots for drug delivery and therapy. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 3, p. 263–267, mar. 2008.
- QIAN, H.; ZHU, Y.; JIN, R. Atomically precise gold nanocrystal molecules with surface plasmon resonance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos, v. 109, n. 3, p. 696–700, jan. 2012.
- QUEVEDO, A. C. *et al.* UV-vis spectroscopic characterization of nanomaterials in aqueous media. **Journal of Visualized Experiments**, Estados Unidos, n. 176, p. 61764, out. 2021.
- RAMAZANZADEH, B. *et al.* Comparison of Antibacterial Effects of ZnO and CuO Nanoparticles Coated Brackets against Streptococcus Mutans. **Journal of dentistry**, Estados

Unidos, v. 16, n. 3, p. 200–5, set. 2015.

RAMOHLOLA, K. E. *et al.* Instrumental Techniques for Characterization of Molybdenum Disulphide Nanostructures. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, Estados Unidos, v. 2020, dez. 2020.

RASMUSSEN, M. K.; PEDERSEN, J. N.; MARIE, R. Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. **Nature Communications**, Estados Unidos, v. 11, n. 1, p. 1–8, dez. 2020.

REDDY, C. N.; REDDYPRASAD, P.; SREEDHAR, N. Electrochemical analysis of anticancer drug zanosar in pharmaceutical and biological samples by differential pulse polarography. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, Estados Unidos, v. 2013, 2013.

REZENDE, J. DE P. *et al.* Temperature modulation of lutein-lysozyme hydrophobic-hydrophilic interaction balance. **Journal of Molecular Liquids**, Estados Unidos, v. 316, p. 113887, 2020.

REZENDE, J. DE P. *et al.* Thermodynamic and kinetic study of epigallocatechin-3-gallate-bovine lactoferrin complex formation determined by surface plasmon resonance (SPR): A comparative study with fluorescence spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, Estados Unidos, v. 95, p. 526–532, 2019.

RISS, T. L. *et al.* *Cell Viability Assays*. **Assay Guidance Manual**, Estados Unidos, 2004.

ROGACH, A. L. *et al.* Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art. **Journal of Physical Chemistry C**, Estados Unidos, v. 111, n. 40, p. 14628–14637, 2007.

SANDRI, C. *et al.* Pontos quânticos ambientalmente amigáveis: Destaque para o óxido de zinco. **Química Nova**, Brasil, v. 40, n. 10, p. 1215–1227, 2017.

SAPSFORD, K. E. *et al.* Biosensing with Luminescent Semiconductor Quantum Dots. **Sensors**, Estados Unidos, v. 6, n. 8, p. 925–953., ago. 2006.

SARFRAZ, N.; KHAN, I. Plasmonic Gold Nanoparticles (AuNPs): Properties, Synthesis and their Advanced Energy, Environmental and Biomedical Applications. **Chemistry – An Asian Journal**, Índia, v. 16, n. 7, p. 720–742, abr. 2021.

SCHNEEMILCH, M.; QUIRKE, N. Free energy of adsorption of supported lipid bilayers from molecular dynamics simulation. **Chemical Physics Letters**, Estados Unidos, v. 664, n. 664, p. 199–204, nov. 2016.

SCHNEEMILCH, M.; QUIRKE, N. Predicting nanoparticle uptake by biological membranes: theory and simulation. **Molecular Simulation**, Estados Unidos, p. 1–18, nov. 2021.

SCHNEIDER, R. *et al.* pH and concentration dependence of the optical properties of thiol-capped CdTe nanocrystals in water and D2O. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Estados Unidos, v. 18, p. 19083–19092, 2016.

- SCHOLZ, F. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. **ChemTexts**, Estados Unidos, v. 1, n. 4, p. 1–24, dez. 2015.
- SHEVTSOV, M. *et al.* Recent Advances in Gold Nanoformulations for Cancer Therapy. **Current Drug Metabolism**, Estados Unidos, v. 19, n. 9, p. 768–780, jun. 2018.
- SHI, L. *et al.* Synthesis and Application of Quantum Dots FRET-Based Protease Sensors. **Journal of the American Chemical Society**, Estados Unidos, v. 128, n. 32, p. 10378–10379, ago. 2006.
- SILVA, FERNANDA O *et al.* Effect of surface ligands on the optical properties of aqueous soluble CdTe quantum dots. **Nanoscale Research Letters**, Estados Unidos, v. 7, n. 1, p. 536, dez. 2012.
- SILVA, FERNANDA OLIVEIRA *et al.* O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Química Nova**, Brasil, v. 33, n. 9, p. 1933–1939, 2010.
- SILVA, L. P. *et al.* Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, Brasil, v. 4, p. 967–1012, 2017.
- SIMONELLI, F.; ROSSI, G.; MONTICELLI, L. Role of Ligand Conformation on Nanoparticle-Protein Interactions. **Journal of Physical Chemistry B**, Estados Unidos, v. 123, n. 8, p. 1764–1769, fev. 2019.
- SKOGLUND, S. *et al.* Difficulties and flaws in performing accurate determinations of zeta potentials of metal nanoparticles in complex solutions—Four case studies. **Plos One**, Estados Unidos, v. 12, n. 7, p. e0181735, jul. 2017.
- SMITH, D. J. Characterization of nanomaterials using transmission electron microscopy. **RSC Nanoscience and Nanotechnology**, Estados Unidos, p. 1–29, jan. 2015.
- SOUSA, J. C. L. *et al.* Determination of particle size distribution of water-soluble CdTe quantum dots by optical spectroscopy. **RSC Advances**, Estados Unidos, v. 4, n. 68, p. 36024–36030, ago. 2014.
- STANISAVLJEVIC, M. *et al.* Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer-based nanosensors and their application. **Biosensors and Bioelectronics**, Estados Unidos, v. 74, p. 562–574, 2015.
- STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Estados Unidos, v. 55, n. 11, p. 2324–2337, nov. 2015.
- STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, Estados Unidos, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.
- SUSHNITHA, M. *et al.* Cell Membrane-Based Biomimetic Nanoparticles and the Immune System: Immunomodulatory Interactions to Therapeutic Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 8, p. 627, jun. 2020.

SUZUKI, M.; YAGUCHI, T.; ZHANG, X. F. High-resolution environmental transmission electron microscopy: Modeling and experimental verification. **Journal of Electron Microscopy**, Estados Unidos, v. 62, n. 4, p. 437–450, ago. 2013.

TANTRA, R.; SCHULZE, P.; QUINCEY, P. Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility. **Particuology**, Estados Unidos, v. 8, n. 3, p. 279–285, jun. 2010.

TEULON, J. M. *et al.* On the operational aspects of measuring nanoparticle sizes. **Nanomaterials**, Estados Unidos, v. 9, n. 1, 2019.

TOMASZEWSKA, E. *et al.* Detection limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids. **Journal of Nanomaterials**, Estados Unidos, v. 2013, 2013.

TRIPATHI, K.; DRISKELL, J. D. Quantifying Bound and Active Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles: A Comprehensive and Robust Approach to Evaluate Immobilization Chemistry. **ACS Omega**, Estados Unidos, v. 3, n. 7, p. 8253–8259, 2018.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, Estados Unidos, v. 31, n. 2, p. 455–461. 2009.

VALE, B. R. C.; VIEIRA, K. O.; SOUSA, J. C. L.; FERRARI, J. L.; *et al.* Efeito da estrutura molecular de ligantes de superfície em pontos quânticos de CdTe dispersos em água. **Química Nova**, Brasil, v. 38, n. 1, p. 22–29, 2015.

VALE, B. R. C. *et al.* Ligand induced switching of the band alignment in aqueous synthesized CdTe/CdS core/shell nanocrystals. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

VALES, G. *et al.* Size, surface functionalization, and genotoxicity of gold nanoparticles in vitro. **Nanomaterials**, Estados Unidos, v. 10, n. 2, p. 271, fev. 2020.

VALLENS, M. *Interactions of Phosphatidylcholine Vesicles and Citrate-stabilized Gold Nanoparticles*. **University Honors Theses**, Estados Unidos, v.692, maio 2019.

VAN LEHN, R. C. *et al.* Effect of particle diameter and surface composition on the spontaneous fusion of monolayer-protected gold nanoparticles with lipid bilayers. **Nano Letters**, Estados Unidos, v. 13, n. 9, p. 4060–4067, set. 2013.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. **Small**, Estados Unidos, v. 6, n. 1, p. 12–21, jan. 2010.

VIJIAN, D. *et al.* Non-protein coding RNA-based genosensor with quantum dots as electrochemical labels for attomolar detection of multiple pathogens. **Biosensors and Bioelectronics**, Estados Unidos, v. 77, p. 805–811, 2016.

VORÁČOVÁ, I. *et al.* Determination of ζ -potential, charge, and number of organic ligands on

the surface of water soluble quantum dots by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Estados Unidos, v. 36, n. 6, p. 867–874, mar. 2015.

WANG, JIE; ZHANG, J.; DENG, D. Phosphine-free synthesis of high-quality CdTe quantum dots: The combination of TeO₂-dodecanethiol and oleylamine as Te precursor. **Materials Letters**, Estados Unidos, v. 191, n. 191, p. 50–52, 15 mar. 2017.

WANG, JING *et al.* One-pot synthesis of highly luminescent N-acetyl-l-cysteine-capped CdTe quantum dots and their size effect on the detection of glutathione. **New Journal of Chemistry**, Estados Unidos, v. 42, n. 19, p. 15743–15749, set. 2018.

WANG, J.; LI, H.; XU, B. Biological functions of supramolecular assemblies of small molecules in the cellular environment. **RSC Chemical Biology**, Estados Unidos, v. 2, n.2, p. 289-305, abr 2021.

WANG, W.; ROBERTS, C. J. Non-Arrhenius Protein Aggregation. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, Estados Unidos, v. 15, p. 840–851, 2013.

WANG, X. *et al.* Quantum dots mediated fluorescent “turn-off-on” sensor for highly sensitive and selective sensing of protein. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Estados Unidos, v. 185, n. 2019, p. 110599, out. 2020.

WANG, Z. *et al.* Structural studies of several clinically important oncology drugs in complex with human serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Estados Unidos, v. 1830, n. 12, p. 5356–5374, dez. 2013.

WATSON, H. Biological membranes. **Essays in Biochemistry**, Estados Unidos, v. 59, p. 43–70, nov. 2015.

WEIR, E. *et al.* The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization. **Analyst**, Estados Unidos, v. 133, n. 7, p. 835-45, jul. 2008.

WU, X. *et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. **Nature Biotechnology**, Estados Unidos, v. 21, n. 1, p. 41–46, 1 jan. 2003.

XIANG, X. *et al.* The relationship between the length of surface ligand and effects of CdTe quantum dots on the physiological functions of isolated mitochondria. **Chemosphere**, Estados Unidos, v. 184, p. 1108–1116, 2017.

XIAO, J. *et al.* Systematic investigation of the influence of CdTe QDs size on the toxic interaction with human serum albumin by fluorescence quenching method. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Estados Unidos, v. 76, p. 93–97, 2010.

XIAO, Q. *et al.* Direct observation of the binding process between protein and quantum dots by insitu surface plasmon resonance measurements. **Nanotechnology**, Estados Unidos, v. 20, n. 32, p. 325101, ago. 2009.

XIAO, Q. *et al.* Systematically investigations of conformation and thermodynamics of HSA

adsorbed to different sizes of CdTe quantum dots. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Estados Unidos, v. 102, p. 76–82, 2013.

XIONG, R. *et al.* Comparison of gold nanoparticle mediated photoporation: Vapor nanobubbles outperform direct heating for delivering macromolecules in live cells. **ACS Nano**, Estados Unidos, v. 8, n. 6, p. 6288–6296, jun. 2014.

YAN, M. *et al.* An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. **Toxicology**, Estados Unidos, v. 282, n. 3, p. 94–103, 2011.

YAN, R. *et al.* The interactions of CdTe quantum dots with serum albumin and subsequent cytotoxicity: The influence of homologous ligands. **Toxicology Research**, Estados Unidos, v. 7, n. 2, p. 147–155, 2018.

YANG, H. *et al.* Highly luminescent polymer particles driven by thermally reduced graphene quantum dot surfactants. **ACS Macro Letters**, Estados Unidos, v. 3, n. 10, p. 985–990, 2014.

YU, W. W. *et al.* Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. **Chemistry of Materials**, Estados Unidos, v. 15, n. 14, p. 2854–2860, 2003.

YU, X. *et al.* Design of Nanoparticle-Based Carriers for Targeted Drug Delivery. **Journal of Nanomaterials**, Estados Unidos, v. 2016, 2016.

ZHANG, H. *et al.* Cooperative transmembrane penetration of nanoparticles. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 5, n. 1, p. 1–10, maio 2015.

ZHANG, S. QI *et al.* Surface loading of nanoparticles on engineered or natural erythrocytes for prolonged circulation time: strategies and applications. **Acta Pharmacologica Sinica**, Estados Unidos, v. 42, p. 1040–1054, jul. 2021.

ZHANG, X. *et al.* Natural channel protein inserts and functions in a completely artificial, solid-supported bilayer membrane. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 3, n. 1, p. 1–7, jul. 2013.

ZHENG, T.; BOTT, S.; HUO, Q. Techniques for Accurate Sizing of Gold Nanoparticles Using Dynamic Light Scattering with Particular Application to Chemical and Biological Sensing Based on Aggregate Formation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Estados Unidos, v. 8, n. 33, p. 21585–21594, ago. 2016.

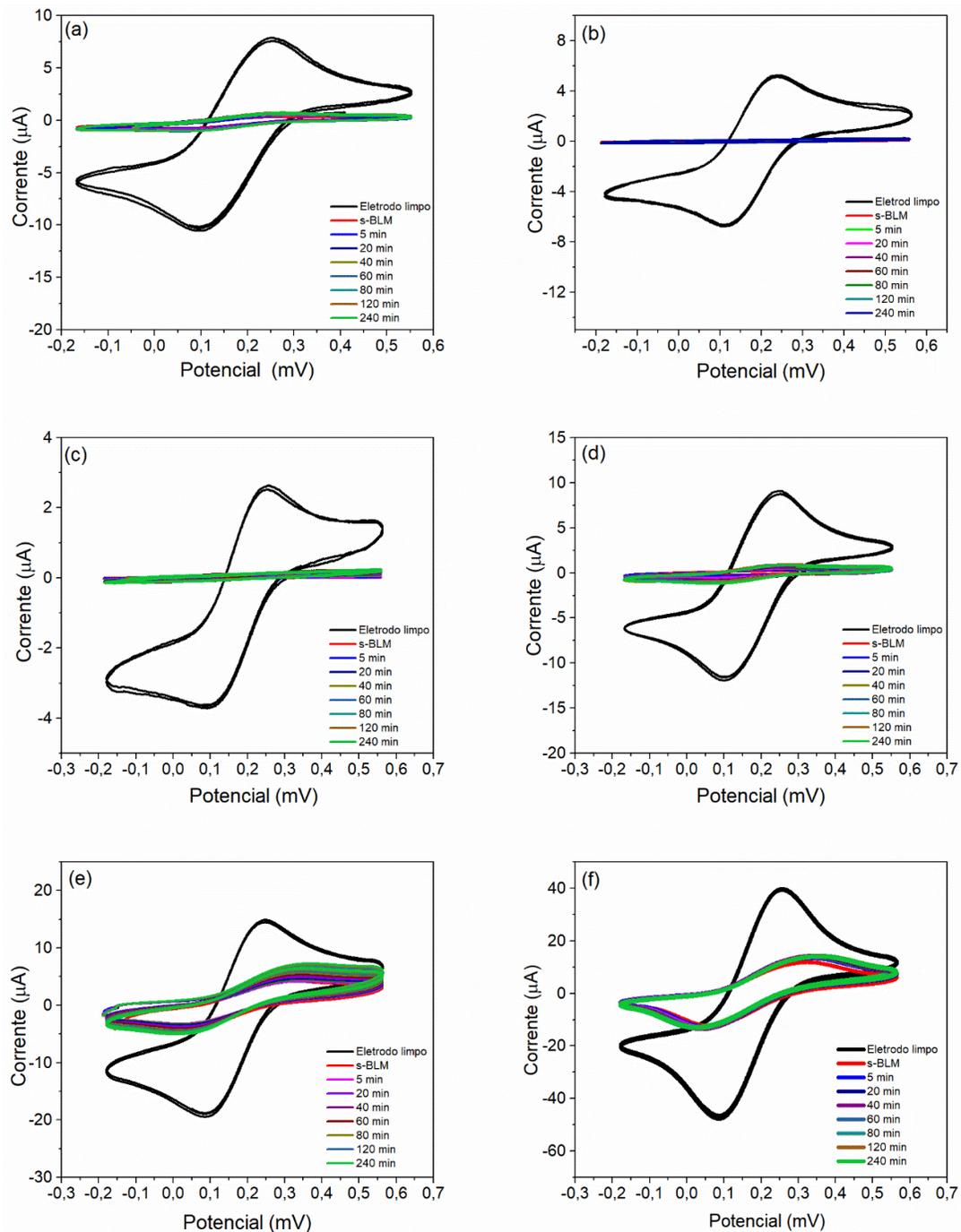
ZHOU, H. X.; PANG, X. Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. **Chemical Reviews**, Estados Unidos, v. 118, n. 4, p. 1691–1741, jan. 2018.

ZHOU, J. *et al.* Cationic carbon quantum dots derived from alginate for gene delivery: One-step synthesis and cellular uptake. **Acta Biomaterialia**, Estados Unidos, v. 42, p. 209–219, 2016.

ZRAZHEVSKIY, P.; SENA, M.; GAO, X. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. **Chemical Society Reviews**, Estados Unidos, v. 39, n. 11, p. 4326–4354, 2010.

APÊNDICE

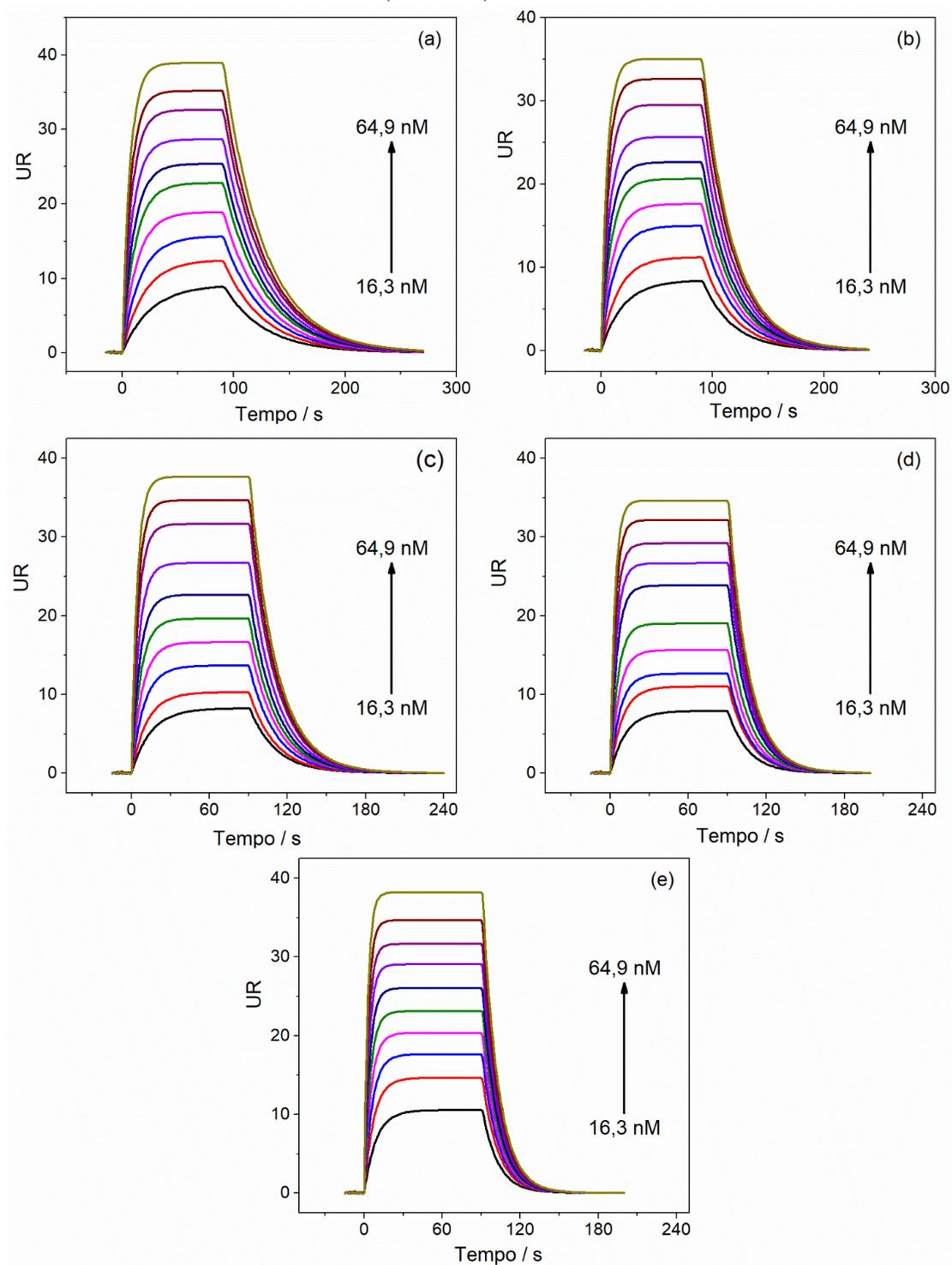
Apêndice A - Voltamogramas obtidos para estudo da formação da membrana de bicamada lipídica (s-BLM).



Fonte: Da autora.

Legenda: Tempos de formação da s-BLM: (a) 1 minuto, (b) 2 minutos, (c) 3 minutos, (d) 4 minutos, (e) 5 minutos e (f) 6 minutos, com os respectivos tempos de varredura.

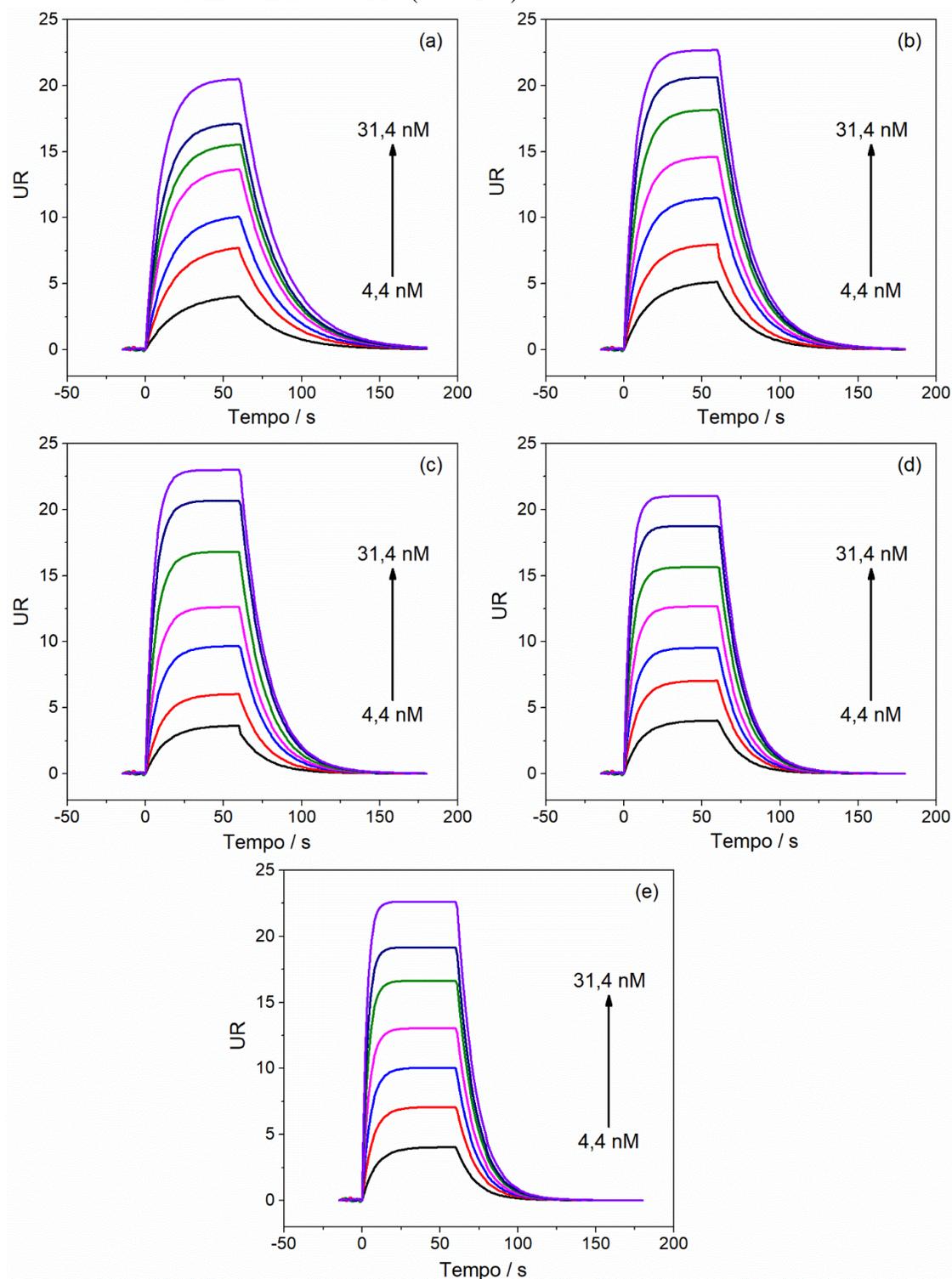
Apêndice B - Diagramas de sensores (UR vs. Tempo) para soluções CdTe@MPA 16,3 - 64,9 nM que fluem sobre uma superfície de chip sensor imobilizado por HSA de baixa densidade CM5 (3893 UR).



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) 285,15 K, (b) 289,15 K, (c) 293,15 K, (d) 297,15 K e (e) 301,15 K.

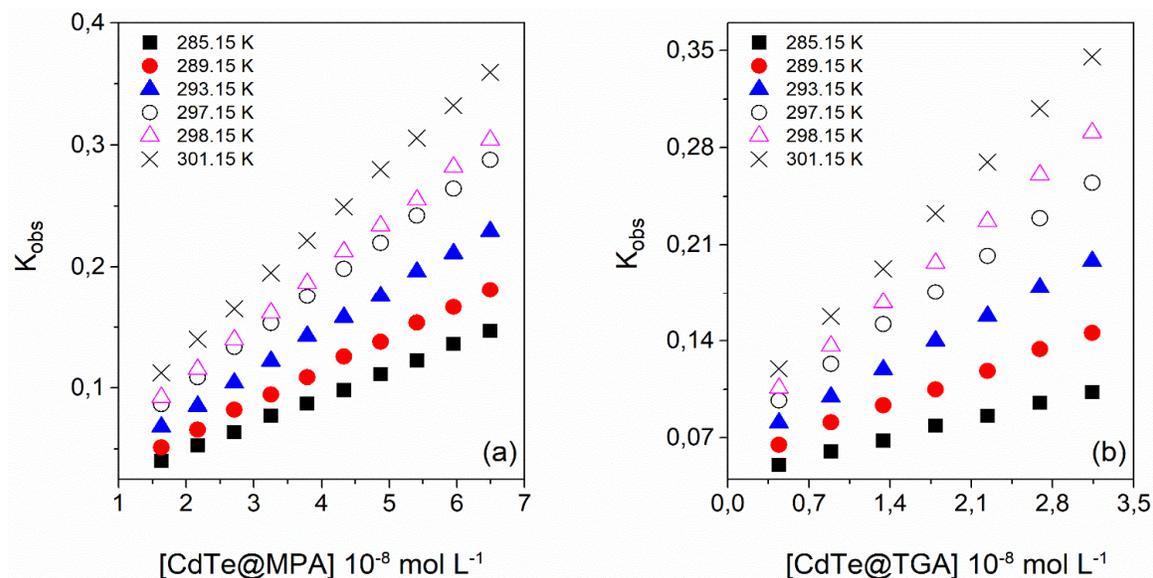
Apêndice C - Diagramas de sensores (UR vs. Tempo) para soluções CdTe@TGA de 4,4 a 31,4 nM que fluem sobre uma superfície de chip sensor imobilizado por HSA de baixa densidade CM5 (3893 RU).



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) 285,15 K, (b) 289,15 K, (c) 293,15 K, (d) 297,15 K e (e) 301,15 K.

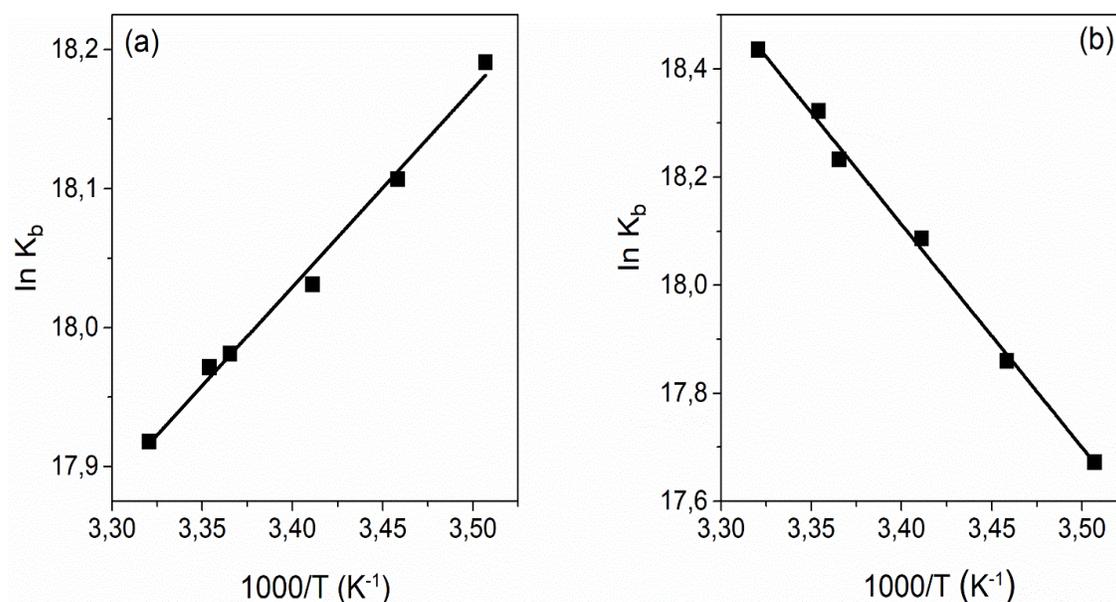
Apêndice D - Gráfico de K_{obs} em função da $[CdTe@MPA]$ e $[CdTe@TGA]$, usada para determinar o k_a em diferentes temperaturas.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) CdTe@MPA e (b) CdTe@TGA. (■) 285,15 K; (●) 289,15 K; (▲) 293,15 K; (○) 297,15 K, (△) 298,15 K e (X) 301,15 K.

Apêndice E – Gráfico de $\ln K_b$ vs. $1/T$ (abordagem van't Hoff) para interação de HSA com PQs.



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) HSA-CdTe@MPA e (b) HSA-CdTe@TGA obtido a partir de experimentos de SPR.