

Nanopartículas Core-Shell Ag@Au suportadas em Óxido de Grafeno: interação com proteínas plasmáticas e toxicidade em hemácias

Diego Stéfani Teodoro Martinez (Orientador)

Laboratório Nacional de Nanotecnologia, CNPEM, Campinas-SP

Valéria Spolon Marangoni (Co-orientadora)

Illum Escola de Ciências, CNPEM, Campinas-SP.

1. Introdução

A combinação de dois ou mais nanomateriais (NMs) para formar nanohíbridos (NH) pode gerar novas funcionalidades e/ou propriedades aprimoradas. Nanomateriais metálicos apresentam propriedades ópticas únicas devido a ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR, do inglês) e ampla possibilidade de aplicações em áreas como catálise, energia, medicina, drug delivery, além do diagnóstico e tratamento de diversas doenças como o câncer (Hutter & Fendler, 2004). Dentre as nanoestruturas plasmônicas, podemos destacar as nanopartículas de prata e ouro, cujas bandas de absorção plasmônica de superfície se manifestam na região do visível e do infravermelho próximo (NIR, do inglês) no espectro eletromagnético.

Estruturas do tipo core-shell têm se destacado por apresentar vantagens quando comparadas a nanopartículas homogêneas, pois, ao unir materiais, não só permite a combinação das propriedades específicas de cada componente separadamente como também pode resultar em novos fenômenos como consequência da interação entre o núcleo (core) e a camada mais externa (shell). Alguns fenômenos já reportados na literatura em sistemas core-shell são o deslocamento e o surgimento de novas bandas de absorção plasmônica devido ao acoplamento dos plasmons da parte interna e externa da partícula, além da melhora no desempenho catalítico. Ainda, estudos têm reportado a melhora da estabilidade em diversos sistemas do tipo core-shell, já que a camada externa pode exercer uma função de proteção evitando degradação do núcleo (Marangoni et al., 2017).

Graças aos grupos oxigenados (epóxido, hidroxila, carboxila e carbonila) presentes no GO, é possível sua combinação com nanopartículas metálicas, resultando na formação de NH de grafeno-metal. Esses NH de óxido de grafeno representam materiais avançados, caracterizados por funcionalidades aprimoradas e propriedades notáveis que os tornam úteis em diversas aplicações. Por exemplo, o híbrido de GO com ouro tem sido utilizado em biossensores, terapia contra o câncer e bioimagem (Amir et al., 2020). Por outro lado, o híbrido de GO decorado com prata possui ação antimicrobiana (Bakhsheshi-Rad et al., 2020) e, conseqüentemente, pode ser usado na engenharia de tecidos (Salleh et al., 2022).

Embora a produção e a tecnologia de NH possam trazer muitos benefícios, já que as partículas apresentam propriedades novas e aprimoradas, o impacto na saúde humana e no meio ambiente pode diferir daquele dos componentes constituintes. Portanto, avaliação da toxicidade, é crucial para uma aplicação e comercialização seguras desses

materiais, avançando em direção a uma inovação sustentável e responsável, prevenindo impactos na saúde humana e no meio ambiente (de Medeiros et al., 2021).

Após interagirem com o ambiente biológico, os nanomateriais entram rapidamente em contato com biomoléculas, como polissacarídeos e proteínas. Isso resulta na formação de uma camada biológica sobre a superfície dos nanomateriais, conhecida como biocorona, que altera sua identidade e a forma como interagem com o ambiente e os organismos presentes nele. A composição e estrutura da biocorona são extremamente complexas e dependem de diversos fatores, como as propriedades físico-químicas do nanomaterial (por exemplo, forma, tamanho, composição, grupos funcionais e carga na superfície), a natureza e composição do meio biológico, e o tempo de exposição. A biocorona é, de fato, a primeira interface que entra em contato com a célula e influencia a internalização celular, bem como a interação dos nanomateriais com os componentes subcelulares, podendo ter um impacto significativo na resposta biológica dos nanomateriais em testes nanotoxicológicos (Chetwynd et al., 2019; Monopoli et al., 2012).

Portanto é fundamental estudar essas interações e seus efeitos na toxicidade. Considerando o destaque crescente nas aplicações biomédicas dos híbridos de GO com prata e ouro, e considerando que o sistema circulatório é a porta de entrada para o corpo humano, é fundamental compreender as interações que os NMs terão com os componentes sanguíneos. O sangue humano é um ambiente fisiologicamente complexo, composto aproximadamente por 55% de plasma, 45% de hemácias e menos de 1% de leucócitos e plaquetas. Dado que o plasma é o componente mais prevalente no sangue, é inevitável que os nanomateriais interajam com ele, e considerando que mais de 200 proteínas estão presentes nele, é inevitável que os nanomateriais interajam com ele, resultando na formação da corona proteica, está pode modular o efeito toxicológico do nanomaterial e por isso deve ser levada em consideração nos estudos nanotoxicológicos.

Um bioensaio que tem ganhado destaque na avaliação da toxicidade de nanomateriais, especialmente aqueles destinados a aplicações biomédicas, é o ensaio de hemólise. Trata-se de um ensaio simples e acessível, no qual se quantifica a liberação de hemoglobina após a interação das hemácias com os NMs. Assim, este estudo tem como objetivo compreender as interações entre os nanomateriais e as biomoléculas do plasma sanguíneo, bem como seu efeito na hemólise.

2. Metodologia

2.1. Síntese e caracterização dos nanomateriais

Os materiais serão sintetizados e fornecidos pelo grupo da Profa. Valéria Spolon Marangoni (Illum/CNPEM).

2.2. Preparo da Hard corona

Para formar a protein corona, 100 mg L⁻¹ do nanomaterial interagirá por 1 hora a 37°C com 1000 mg L⁻¹ de plasma humano. Após essa interação, as amostras serão centrifugadas a 14.000 rpm por 1 hora a 4°C. O sobrenadante será removido e o pellet ressuspenso em 100 µL de PBS. Em seguida, o volume será ajustado para 1 mL com PBS 1x gelado, e as amostras serão centrifugadas novamente a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C para lavagem. Esse processo de lavagem será repetido três vezes. Após a última

lavagem, 100 μL de UPW serão adicionados às amostras e homogeneizadas até que o pellet se dissolva completamente. Após este procedimento, as amostras serão usadas nos ensaios de hemólise, ou as proteínas serão extraídas para caracterização por SDS-PAGE.

2.3. Eletroforese SDS-PAGE

Para extração das proteínas e caracterização por eletroforese SDS-PAGE, as amostras serão sonificadas em banho ultrassônico por 2 minutos a 40 Hz. Para desenovelar as proteínas, quebrar as pontes dissulfeto e estabilizar a hard corona, serão adicionados 40 μL de SDS blue 3x (Sodium Dodecyl Sulphate) e 10 μL de DTT (Ditiotreitol). As amostras são novamente sonificadas por 2 minutos e aquecidas a 99°C por 3 minutos em um termobloco para extração das proteínas. Então, 10 μL das amostras serão carregadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. O gel obtido será corado com azul de Coomassie.

2.4. Estabilidade coloidal

Para avaliar a influência dos meios de exposição, na presença e ausência da protein corona serão realizados estudos de agregação e estabilidade coloidal. Serão empregadas as técnicas de Espectroscopia UV-Vis, Ultracentrifugação, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e eletroforético (ELS).

2.5. Ensaio Hemolítico

Os ensaios hemolíticos serão conduzidos utilizando bolsas de concentrado de hemácias fornecidas pelo banco de sangue da FCM (Faculdade de Ciências Médicas) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Inicialmente, as hemácias serão submetidas a uma lavagem para remover hemoglobina residual. Após esse processo os nanomateriais com e sem protein corona serão expostos a hemácias nas concentrações de 1,0 a 150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras serão então incubadas a 37°C em um termobloco por 60 minutos. Após a incubação, as amostras serão centrifugadas novamente e o sobrenadante analisado por UV-Vis a 540 nm. O PBS 1x será usado como controle negativo de hemólise, enquanto a água ultrapura (UPW) será utilizada como controle positivo, uma vez que é um meio hipotônico capaz de romper as hemácias, liberando hemoglobina no sobrenadante.

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios de hemólise e adsorção serão submetidos a uma Análise de Variância unilateral (ANOVA one-way), seguida pelo teste de Dunnett, para verificar se haverá diferença estatística entre os grupos experimentais, assim como em relação ao grupo controle. Os resultados serão expressos em Média \pm Desvio Padrão (DP).

3. Objetivos

O principal objetivo deste projeto é estudar a interação de nanopartículas core-shell Ag@Au suportadas em óxido de grafeno (GO-Ag@Au) com biomoléculas do plasma

sanguíneo (formação de biocorona) e seus reflexos na toxicidade/biocompatibilidade em hemácias.

4. Referências

- Amir, M. N. I., Halilu, A., Julkapli, N. M., & Ma'amor, A. (2020). Gold-graphene oxide nanohybrids: A review on their chemical catalysis. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 83, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.11.029>
- Bakhsheshi-Rad, H. R., Ismail, A. F., Aziz, M., Akbari, M., Hadisi, Z., Khoshnava, S. M., Pagan, E., & Chen, X. (2020). Co-incorporation of graphene oxide/silver nanoparticle into poly-L-lactic acid fibrous: A route toward the development of cytocompatible and antibacterial coating layer on magnesium implants. *Materials Science and Engineering: C*, 111, 110812. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110812>
- Chetwynd, A. J., Wheeler, K. E., & Lynch, I. (2019). Best practice in reporting corona studies: Minimum information about Nanomaterial Biocorona Experiments (MINBE). *Nano Today*, xxx, 100758. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.06.004>
- de Medeiros, A. M. Z., Khan, L. U., da Silva, G. H., Ospina, C. A., Alves, O. L., de Castro, V. L., & Martinez, D. S. T. (2021). Graphene oxide-silver nanoparticle hybrid material: an integrated nanosafety study in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111776. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111776>
- Hutter, E., & Fendler, J. H. (2004). Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Advanced Materials*, 16(19), 1685–1706. <https://doi.org/10.1002/adma.200400271>
- Marangoni, V. S., Neumann, O., Henderson, L., Kaffes, C. C., Zhang, H., Zhang, R., Bishnoi, S., Ayala-Orozco, C., Zucolotto, V., Bankson, J. A., Nordlander, P., & Halas, N. J. (2017). Enhancing T₁ magnetic resonance imaging contrast with internalized gadolinium(III) in a multilayer nanoparticle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(27), 6960–6965. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701944114>
- Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7(12), 779–786. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>
- Salleh, A., Mustafa, N., Teow, Y. H., Fatimah, M. N., Khairudin, F. A., Ahmad, I., & Fauzi, M. B. (2022). Dual-Layered Approach of Ovine Collagen-Gelatin/Cellulose Hybrid Biomatrix Containing Graphene Oxide-Silver Nanoparticles for Cutaneous Wound Healing: Fabrication, Physicochemical, Cytotoxicity and Antibacterial Characterisation. *Biomedicines*, 10(4), 816. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040816>

