



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS



RAFAEL LEANDRO FERNANDES MELO

FORMAÇÃO DA CORONA DE LISOZIMA E ALBUMINA EM NANOPARTÍCULAS DE
OURO VIA MODELAGEM MOLECULAR

MOSSORÓ
2019

RAFAEL LEANDRO FERNANDES MELO

FORMAÇÃO DA CORONA DE LISOZIMA E ALBUMINA EM NANOPARTÍCULAS DE
OURO VIA MODELAGEM MOLECULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Roner Ferreira da Costa, Prof. Dr.

Co-orientadora: Eveline Matias Bezerra, Prof^a.
Dra.

MOSSORÓ
2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

M528f Melo, Rafael Leandro Fernandes.
 Formação da corona de lisozima e albumina em
 nanopartículas de ouro via modelagem molecular /
 Rafael Leandro Fernandes Melo. - 2019.
 89 f. : il.

 Orientador: Roner Ferreira da Costa Costa.
 Coorientadora: Eveline Matias Bezerra Bezerra.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
 Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
 Ciência e Engenharia de Materiais, 2019.

 1. Efeito Corona. 2. Nanopartículas de ouro. 3.
 Modelagem Molecular. I. Costa, Roner Ferreira da
 Costa, orient. II. Bezerra, Eveline Matias
 Bezerra, co-orient. III. Título.

RAFAEL LEANDRO FERNANDES MELO

FORMAÇÃO DA CORONA DE LISOZIMA E ALBUMINA EM NANOPARTÍCULAS DE
OURO VIA MODELAGEM MOLECULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Roner Ferreira da Costa, Prof. Dr.

Co-orientadora: Eveline Matias Bezerra, Profª. Dra.

Defendida em: 11 / 04 / 2019.

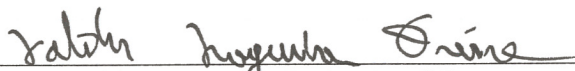
BANCA EXAMINADORA



Roner Ferreira da Costa, Prof. Dr.
(UFERSA)
Presidente



Eveline Matias Bezerra, Profª. Dra.
(UFRN)
Membro Examinador



Valder Nogueira Freire, Prof. Dr.
(UFC)
Membro Examinador



José Junior Alves da Silva, Prof. Dr.
(UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Roner Ferreira da Costa, e a Professora Eveline Matias Bezerra pela confiança e pelo incentivo fornecido, além de não medirem esforços para disponibilizar todos os meios possíveis e impossíveis para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também pelos excelentes conselhos e amizade.

A CAPES e CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

Ao Professor Francisco Franciné Maia Junior, por sempre estar disponível para me ajudar e por ter participado da minha banca de projeto de qualificação.

Ao Professor Pablo Abreu de Moraes pelas valiosíssimas contribuições dadas para a realização deste trabalho, estando sempre disponível em colaborar.

Aos Professores Valder Nogueira Freire e José Junior Alves da Silva, por estarem disponíveis a me ajudar com a participação da minha banca de defesa de dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais – PPgCEM, bem como a Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA.

A todos os professores do PPgCEM, pelas contribuições durante minha formação em Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

A todos os colegas que fazem parte do laboratório de Modelagem Molecular, bem como todos os colegas do PPgCEM.

A Professora Isabel Cósta, pelo amor, companheirismo e paciência, bem como pela ajuda em conceitos biológicos nessa pesquisa.

A todos os colegas do Instituto Federal do Ceará – IFCE campus Jaguaribe, pela convivência, ajuda e conselhos.

A minha família, pelo apoio para concretizar esta etapa, em especial a minha mãe por ser um exemplo de mulher trabalhadora.

RESUMO

As nanopartículas de ouro (AuNPs) fazem parte de um universo nanométrico biocompatível em que suas propriedades mecânicas, elétricas, magnéticas e ópticas as tornam interessantes para aplicações biológicas. Essas convertem eficientemente a luz em calor, propriedade que as tornam altamente importante para detecções biológicas e terapêuticas. O interesse com as interações entre AuNPs e proteínas vêm crescendo continuamente na comunidade científica. Sua alta biocompatibilidade faz com que criem interações com moléculas biológicas contidas no plasma sanguíneo, formando uma coroa em sua superfície chamada de efeito corona, quando esse efeito possui predominância de proteínas, dá-se o nome de proteína corona (PC). Os efeitos imprevisíveis relacionados à PC afetam criticamente as respostas terapêuticas, nas quais as AuNPs têm como finalidade. Neste trabalho fizemos uma investigação via modelagem molecular clássica do efeito corona em nanopartículas de ouro (PC@AuNP) utilizando duas proteínas mais comuns no plasma sanguíneo, a lisozima humana (do inglês, *lysozyme*, LYZ, PDB 2nwd) e a albumina humana (do inglês, *human serum albumin*, HSA, PDB 4k2c), com quatro tamanhos de AuNPs esféricas de 2, 4, 6 e 8 nm de diâmetro. As AuNPs, tiveram suas energias e geometrias otimizadas, e as proteínas tiveram suas energias e átomos leves otimizadas, todas via modelagem clássica utilizando o campo de força *Universal*. Após otimizações, as AuNPs foram colocadas para interagir com cada proteína separadamente, realizando varreduras afim de obter os potenciais de energias de interação. Os resultados mostram a relação entre o potencial de energia de interação com a distância entre os centroides das AuNPs com as proteínas. As maiores energias potenciais são visualizadas e indicam as regiões preferenciais de interação das proteínas com cada AuNP. Os resultados das interações da lisozima com as AuNPs (LYS@AuNPs), sugerem que o aumento do tamanho das AuNPs é proporcional ao potencial de energia, e além disso essas possuem três regiões preferenciais de estabilização. Os resultados obtidos entre a albumina e as AuNPs (HSA@AuNPs), não apresentam uma direta proporção entre o aumento da AuNPs com o aumento do potencial de energia, mas também apresentaram três regiões preferenciais de interação.

Palavras – Chaves: Efeito corona. Nanopartículas de ouro. Modelagem molecular.

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNPs) are part of a biocompatible nanometric universe in which their mechanical, electrical, magnetic and optical properties make them interesting for biological applications. These efficiently convert light into heat, a property that makes them highly important for biological and therapeutic sensations. Interest in the interactions between AuNPs and proteins has been growing steadily in the scientific community. Its high biocompatibility causes them to create interactions with biological molecules contained in the blood plasma, forming a crown on its surface called the corona effect, when this effect has a predominance of proteins, it is called corona protein (PC). The unpredictable effects related to CP affect critically the therapeutic responses, in which the AuNPs have as purpose. In this work, we performed an investigation using classical molecular modeling of the corona effect in gold nanoparticles (PC @ AuNP) using two proteins most common in blood plasma, human lysozyme (lysozyme, LYZ, PDB 2nwd) and human albumin English, human serum albumin, HSA, PDB 4k2c), with four spherical AuNPs of 2,4,6 and 8 nm in diameter. The AuNPs had their energies and geometries optimized, and the proteins had their energies and light atoms optimized, all via classical modeling using the Universal force field. After optimizations, the AuNPs were placed to interact with each protein separately, performing scans in order to obtain the potentials of interaction energies. The results show the relationship between the energy potential of interaction with the distance between the centroids of the AuNPs with the proteins. The highest potential energies are visualized and indicate the preferred regions of interaction of the proteins with each AuNP. The results of the interactions of lysozyme with AuNPs (LYS @ AuNPs), suggest that the increase of AuNPs size is proportional to the energy potential, and in addition these have three preferential stabilization regions. The results obtained between albumin and AuNPs (HSA @ AuNPs) do not present a direct proportion between the increase of AuNPs with increased energy potential, but also presented three preferential regions of interaction.

Key Words: Corona effect. Gold nanoparticles. Molecular modeling.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fórmula química e massa atômica obtida com as AuNPs.....	46
Tabela 2: Propriedades das AuNPs antes da otimização.....	47
Tabela 3: Parâmetros utilizados na otimização das AuNPs.	48
Tabela 4: Propriedades das proteínas antes da otimização.....	49
Tabela 5: Propriedades das AuNPs pós otimização.	52
Tabela 6: Propriedades das proteínas pós otimização.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre os universos dimensionais "Nano, Micro e Macro".	16
Figura 2: AuNPs com vários tamanhos e formatos, com potenciais aplicações na biotecnologia. a) Nanopartículas esféricas de 20 nm; b) Nanopartículas esféricas de 200 nm; c) Nanobastões; d) Nanobastões pontiagudos; e) Nanoconchas; f) Nanoestruturas; g) Nanoesferas ocas; h) Tetraedros/octaedros/cubos/icosaedros; i) Dodecaedros; j) Octaedros; k) Nanocubos côncavos; l) Tetrahedros; m) Dodecaedros; n) Bipirâmides; o) Trisoctaedros; p) Nanoprismas.	21
Figura 3: a) DM de AuNPs de 5, 7 nm . b) DM de AuNPs de 8, 6 nm . c) DM de AuNPs de 14, 3 nm . d) DM da melhor situação de endocitose em AuNPs esféricas de 14, 3 nm .	24
Figura 4: DM de AuNPs esferocilíndricas com 50% de cobertura superficial e energia de interação de -5 kT .	24
Figura 5: Influência da carga na endocitose de AuNPs por membranas celulares.	25
Figura 6: Formação do efeito corona em NP biocompatíveis.	26
Figura 7: Formação da PC@AuNP.	27
Figura 8: Organograma da investigação do efeito PC@AuNP.	29
Figura 9: Parâmetros físico químicos que afetam na formação da PC@AuNP	30
Figura 10: Relação do aumento da AuNP na formação da PC@AuNP.	31
Figura 11: Dinâmica molecular da energia de interação de aminoácidos com a superfície do ouro a) Início da simulação t = 0 ns . b) Final da simulação t = 3 ns .	35
Figura 12: Modelagem molecular da interação de nanopartículas de ouro com HSA. a) PMF da interação de nanopartículas: hidrofóbicas, hidrofílicas, negativas e positivas. b) Quantidade de adsorção de HSA na superfície de nanopartículas de ouro.	36
Figura 13: Dinâmica molecular da entrada de nanopartículas com efeito corona em uma membrana plasmática. a) e b) nanopartículas de 3 nm hidrofóbicas. c) e d) nanopartículas de 5 nm com carga positiva.	37
Figura 14: Estrutura terciária da lisozima, 2nwd.	38
Figura 15: Estrutura terciária da albumina, 4k2c.	39
Figura 16: Representação esquemática para demonstração da lei de Hooke.	40
Figura 17: Representação esquemática da fenilalanina para demonstração da energia de interação por alongamento de ligações.	41
Figura 18: Representação da inversão de diedros em uma molécula.	42
Figura 19: Representação da inversão ângulos em uma molécula.	43

Figura 20: Representação esquemática do potencial de energia de interação entre átomos e moléculas.	44
Figura 21: Fluxograma da metodologia de investigação da PC@AuNP empregada nessa pesquisa.	45
Figura 22: Representação das nanopartículas de ouro denominadas AuNPs. I) AuNP2. II) AuNP4. III) AuNP6. IV) AuNP8. Nesta representação as AuNPs estão em escala crescente.....	46
Figura 23: Proteínas modeladas para a pesquisa. I) LYS isolada por Wang Y. (2013), PDB 2nwd. II) HSA isolada por Durek T. (2006), PDB 4k2c.	48
Figura 24: Representação da modelagem das interações Protéina@AuNP, utilizando como exemplo a simulação LYS@AuNP2.	51
Figura 25: (A) Potenciais de energia de interação entre LYS@AuNP2. (B) Maiores potencias de interação da LYS@AuNP2.....	55
Figura 26: Posições de maior afinidade potencial na interação LYS@AuNP2.	56
Figura 27: (A) Potenciais de energia de interação entre LYS@AuNP4. (B) Maiores potencias de interação da LYS@AuNP4.....	58
Figura 28: Posições de maior afinidade potencial na interação LYS@AuNP4.	59
Figura 29: (A) Potenciais de energia de interação entre LYS@AuNP6. (B) Maiores potencias de interação da LYS@AuNP6.....	61
Figura 30: Posições de maior afinidade potencial na interação LYS@AuNP6.	62
Figura 31: (A) Potenciais de energia de interação entre LYS@AuNP8. (B) Maiores potencias de interação da LYS@AuNP8.....	64
Figura 32: Posições de maior afinidade potencial na interação LYS@AuNP8.	65
Figura 33: (A) Maiores potencias de interação dentre todos os eixos modelados das LYS@AuNPs. (B) Posições de maior afinidade potencial dentre todos os eixos na interação LYS@AuNPs.	67
Figura 34: (A) Maiores potencias das LYS@AuNPs. (B) Posições de maior afinidade na interação LYS@AuNPs.....	69
Figura 35: (A) Potenciais de energia de interação entre HSA@AuNP2. (B) Maiores potencias de interação da HSA@AuNP2.	71
Figura 36: Posições de maior afinidade potencial na interação HSA@AuNP2.....	72
Figura 37: (A) Potenciais de energia de interação entre HSA@AuNP4. (B) Maiores potencias de interação da HSA@AuNP4.	74
Figura 38: Posições de maior afinidade potencial na interação HSA@AuNP4.....	75

Figura 39: (A) Potenciais de energia de interação entre HSA@AuNP6. (B) Maiores potencias de interação da HSA@AuNP6.	77
Figura 40: Posições de maior afinidade potencial na interação HSA@AuNP6.	78
Figura 41: (A) Potenciais de energia de interação entre HSA@AuNP8. (B) Maiores potencias de interação da HSA@AuNP8.	80
Figura 42: Posições de maior afinidade potencial na interação HSA@AuNP8.	81
Figura 43: (A) Maiores potencias de interação dentre todos os eixos modelados da HSA@AuNPs. (B) Posições de maior afinidade potencial dentre todos os eixos na interação HSA@AuNPs.	83
Figura 44: (A) Maiores potencias da HSA@AuNPs. B) Posições de maior afinidade na interação HSA@AuNPs.	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNTAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1. NANOPARTÍCULAS	16
2.1.1. Nanopartículas de ouro.....	19
2.2. EFEITO CORONA	26
2.3. PROTEÍNAS QUE MAIS FORMAM A PC@AuNP	30
2.4. PARAMETROS QUE AFETAM A FORMAÇÃO DA PC@AuNP	30
2.4.1. Parâmetros físico químico	30
2.4.2. Parâmetros do meio	32
2.4. INTERAÇÕES QUE ENVOLVEM A PC@AuNP	32
2.5. TECNICAS DE ANÁLISE DE PC@AuNP.....	33
2.5.1. Estudos experimentais	33
2.5.2. Estudos <i>in silico</i>	34
2.6. PROTEÍNAS.....	37
2.6.1. Lisozima humana	38
2.6.2. Albumina humana.....	38
2.7. MODELALAGEM MOLECULAR.....	39
2.8. MECÂNICA MOLECULAR.....	40
3. METODOLOGIA	45
3.1. MODELAGEM MOLECULAR DAS NANOPARTÍCULAS E PROTEÍNAS	46
3.2. MODELAGEM MOLECULAR DA INTERAÇÃO PROTEÍNA@AUNP.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1. MODELAGEM MOLECULAR DAS NANOPARTÍCULAS E PROTEÍNAS	51
4.1.1. Otimização das nanopartículas	51
4.1.2. Otimização das proteínas.....	53
4.2. MODELAGEM MOLECULAR DA INTERAÇÃO PROTEÍNA@AUNP.....	54
4.2.1. Modelagem molecular da interação lisozima com as nanopartículas de ouro	54
4.2.2. Modelagem molecular da interação albumina com as nanopartículas de ouro.	70
5. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

A comunidade científica apresentou no decorrer dos anos um grande interesse na utilização de nanopartículas (NPs) em aplicações biológicas, o grande interesse na sua forma de sintetização é devido sua biocompatibilidade ou alta heterogeneidade, sendo aplicada em diferentes fins terapêuticos (DE DIOS e DÍAZ-GARCÍA, 2010).

Diversas são as funções que as NPs realizam em sistemas biológicos. Nanopartículas de sílica (SiO_2 NPs), por exemplo, apresentam alta porosidade e biocompatibilidade, além de serem biodegradáveis, fatores esses que as tornam ótimas carreadoras de diversos fármacos, sendo utilizadas no *drug delivery* do ibuprofeno, captopril, eritromicina, entre outros (JAFARI e colab., 2019). As nanopartículas de prata (AgNPs) são investigadas como agentes bactericidas, destacando a atual descoberta em atividade de inibição de cepas bacterianas *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (SAEED e THAHIRA, 2019). As nanopartículas de ouro (AuNPs), são as mais pesquisadas, tendo uma alta eficiência no tratamento e diagnóstico contra o câncer (RAJKUMAR e PRABAHARAN, 2019).

Inúmeras outras NPs vão surgindo na comunidade científica para tratamentos específicos de sistemas biológico. Entretanto, suas atividades podem ser comprometida ao entrarem na corrente sanguínea, sendo encapsuladas por outras moléculas biológicas que interagem com suas superfícies, essa adsorção é conhecida como efeito corona, ou efeito Proteína Corona, quando as moléculas são em sua maioria proteínas (CARRILLO-CARRION e colab., 2017; KHARAZIAN e colab., 2016; LAI e colab., 2017; RAMEZANI e colab., 2014)

Quando moléculas biológicas interagem com as NPs, suas finalidades terapêuticas mudam, passando a ter novas características e propriedades. O preenchimento da superfície das NPs por proteínas, possui um nome particular chamado de Proteína Corona (PC) (ZHDANOV, 2018). O efeito corona e a PC pode ser formada em qualquer NPs que seja biocompatível e esteja em um meio propício, apresentando diversos fatores que afetam a sua formação, como por exemplo (i) parâmetros físicos das NPs: a carga, o tamanho, a sua superfície e a forma; (ii) parâmetros do meio à qual ela está submersa: a temperatura, o tempo de circulação, a concentração de proteínas no plasma e o equilíbrio cinético de formação (CARRILLO-CARRION et al., 2017; CHARBGOO et al., 2018; DOCTER et al., 2014).

As interações formadas no efeito corona pode ter dependências das NPs, proteínas ou moléculas biológicas que estão envolvidas (CARRILLO-CARRION e colab., 2017; CHARBGOO e colab., 2018; DING e MA, 2014; DOCTER e colab., 2014; LAI e colab., 2017; PIELLA e colab., 2017). A investigação dessa formação pode passar por estudos experimentais, ou por análises *in silico*.

A modelagem molecular, motivada pelo grande custo experimental, e pela alta evolução de computadores capazes de realizar complexos cálculos matemáticos em um pequeno espaço de tempo, tem seu lugar reservado na pesquisa de efeitos coronas em NPs. Prova disso é a quantidade crescente de publicações científicas com a palavra “*effect corona in nanoparticle molecular modelling*”, saindo de um quantitativo de 100 artigos/ano em 2008 para 701 artigos/ano em 2018 na plataforma *ScienceDirect*, representando um aumento de 700%.

Diante disso, essa pesquisa teve como premissa realizar uma investigação do efeito corona em nanopartículas de ouro via modelagem molecular.

A fundamentação teórica desse trabalho faz uma abordagem de todos os conceitos que abrangem o estudo do efeito corona, é feita uma discussão sobre com destaque para AuNPs, efeito corona, proteínas que mais interagem com as AuNPs, parâmetros que afetam a formação, técnicas de análise com destaque para as análises teóricas, como a modelagem molecular e a mecânica molecular.

A metodologia mostra como foi investigada a influência do tamanho das nanopartículas para a formação do efeito corona, ou como foi o caso PC. Foram utilizadas duas das proteínas que mais interagem com as AuNPs, a lisozima humana e a albumina humana e foram modelados quatro tamanhos esféricos diferentes de AuNPs, colocando-as separadamente para interagir com cada proteína. A interação foi realizada com o auxílio de um *software* de modelagem molecular e com a ajuda de um *script* de interação.

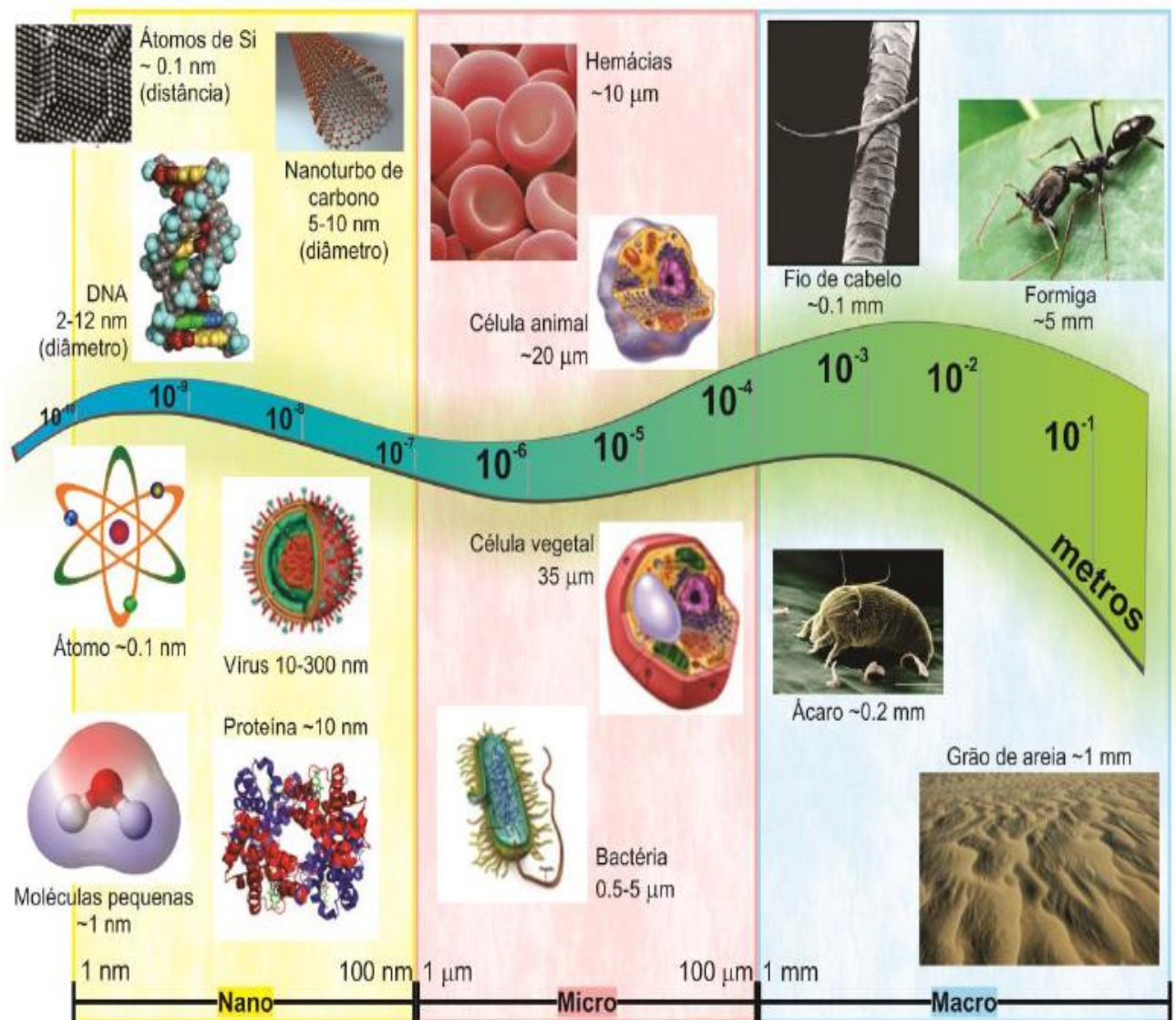
Os resultados da modelagem sugerem que o aumento do tamanho da AuNPs teve influência no potencial de energia de interação quando essa é interagida a lisozima, mas que não teve total influencia quando interagida com a albumina. As conclusões são apresentadas no último capítulo.

2. FUNTAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. NANOPARTÍCULAS

Richard Feynman deu o primeiro passo para manipulação de átomos e moléculas. Décadas depois vários avanços na nanociência foram alcançados permitindo o surgimento da nanotecnologia, bem como o estudo das nanopartículas (NPs) que são partículas da ordem nanométrica, seu prefixo “nano” corresponde a 9ª potência negativa de dez, ou seja, são materiais cujas dimensões estão entre 1 – 100 nm, a figura 1 relaciona as dimensões nanométricas com micrométricas e macrométricas (MASUDA e colab., 2008).

Figura 1: Comparação entre os universos dimensionais "Nano, Micro e Macro".



Fonte: (BEZERRA, 2014).

Nas dimensões nanométrico, as propriedades físicas do material mudam drasticamente em relação ao tamanho macrométrico. Uma das principais razões dessas mudanças está no aumento da área superficial específica (DE DIOS e DÍAZ-GARCÍA, 2010; GRILLO e colab., 2015). Em NPs, o número de átomos, íons ou moléculas, tornam-se maior em sua superfície do que em seu interior, fazendo gerar características mecânica, magnéticas, ópticas e elétricas exclusivas (DE DIOS e DÍAZ-GARCÍA, 2010; MASUDA e colab., 2008).

Essas características, somadas com as diversas nanopartículas existentes, sendo elas poliméricas, semicondutoras ou metálicas, em formas fundidas, agregadas ou aglomeradas de um único ou vários materiais, possuem multidisciplinaridades particulares com aplicações nas áreas da física, química, biologia e engenharia dos materiais, gerando a essência da nanotecnologia (DE DIOS e DÍAZ-GARCÍA, 2010; GRILLO e colab., 2015; MASUDA e colab., 2008).

As NPs poliméricas possuem como principais características serem biodegradáveis e biocompatíveis. Apresentam-se geralmente no formato linear de nanoesferas e nanocápsulas não sendo tóxicas entre 10 – 1000 *nm*. Várias abordagens estão sendo exploradas para o desenvolvimento de novos efetivos agentes antimicrobianos, e as NPs poliméricas somam uma grande parcela desse estudo, foram recentemente investigadas como potenciais novos antibióticos contra doenças infecciosas (LAM e colab., 2018).

Estudos realizados mostraram que NPs poliméricas do tipo lipossomos e do tipo micelas, de várias formas e tamanhos, demonstraram muitas vantagens em relação as NPs poliméricas dos tipos lineares. Os lipossomos e as micelas são formadas por polímeros que se agregam de forma circular (ALAI e colab., 2015). A diferença entre as duas está no fato dos lipossomos formam bicamadas fosfolipídicas, concêntrica e intercaladas com uma parte hidrofóbica formando o núcleo, enquanto uma parte hidrofílica forma a superfície, ao contrário das micelas, que possuem apenas a parte hidrofílica formando a superfície. A grande vantagem das duas é sua multivalência com seu aglomerado de grupos funcionais, melhorando sua capacidade de reconhecimento e ligação celular, além de sua capacidade de encapsulamento de moléculas (LAM e colab., 2018).

Outra forma de NPs poliméricas são os dendrímeros, estes possuem diferentes grupos funcionais ramificados de um núcleo em comum. Uma das principais características é que outras moléculas podem ser conjugadas aos seus grupos funcionais, ou até mesmo podem ser encapsuladas por suas cavidades hidrofóbicas, fazendo com que esses possuam uma ótima

capacidade de transporte de fármacos. Pesquisas recentes, mostram que nanopartículas dendríticas podem modular respostas imunes e serem potencialmente eficientes em doenças infecciosas e na terapia contra o câncer (JO e colab., 2017; KLIPPSTEIN e POZO, 2010; YOON e colab., 2018).

Em NPs semicondutoras, temos como exemplo os pontos quânticos (do inglês, *Quantum Dots*, QDs), esses são nanocristais que exibem características da mecânica quântica. Suas propriedades diferem de acordo com seu tamanho e forma. Os QDs foram descobertos em 2004 durante a purificação de nanotubos de carbono de parede única. Suas propriedades estão relacionadas a fotoestabilidade, gerando excelentes aplicações no campo da biomedicina, optica, sensores e funções catalíticas (DAS e colab., 2018). Uma área promissora na pesquisa dos QDs está relacionada aos microRNAs (miRNAs) estes fazem parte de pequenos RNAs, que estão envolvidos em muitos processos biológicos nos seres vivos. Os QDs foram importantes NPs para o desenvolvimento dessa área, seu tamanho compatível mostrou-se de suma importância para os estudos dos miRNAs, tornando possível sua identificação (GORYACHEVA e colab., 2018).

Os nanotubos de carbono (do inglês, *carbono nanotubes*, CNTs) foram descobertos em 1991 por Sumi Iijima. Esses são nanofitas de grafeno que se enrolam formando um cilindro. Dependendo da direção que as nanofitas de grafeno se enrolam os CNTs podem se tornarem condutores ou semicondutores e adquirirem diferentes propriedades eletrônicas, vibracionais, opticas e mecânicas (MEUNIER e colab., 2016). Além disso, os CNTs podem possuir apenas uma parede (do inglês, *Single – Walled Carbon Nanotubes*, SWCNT) ou multiplas paredes (do inglês, *Multi-Walled Carbon Nanotubes*, MWCNT), que também influenciam diretamente em suas propriedades.

Os CNTs apresentam diversas aplicações sendo atualmente voltadas para o campo do diagnóstico e da terapia contra o câncer. Sua funcionalização variável e compatibilidade com sistemas biológicos tem garantido essa vasta investigação (MERUM e colab., 2017; SHEIKHPOUR e colab., 2017).

Os metais também podem entrar no domínio das nanopartículas. Óxidos ou elementos puros de silício (Si), titânio (Ti), prata (Ag) e ouro (Au), são algumas das muitas nanopartículas metálicas que podem ser sintetizadas. Cada nanopartícula metálica possui propriedades e aplicações particulares, que diferem das propriedades e aplicações que o elemento tem em seu tamanho natural (DE DIOS e DÍAZ-GARCÍA, 2010).

As nanopartículas de SiO_2 (SiO_2NPs) possuem diversos trabalhos na área de agrotecnologia, já que possuem uma porosidade capaz de absorver pesticidas (BAPAT e colab., 2016). Além disso, possuem capacidade de detecção eletroquímica e óptica de enzimas de pesticidas, como por exemplo das acetilcolinesterase e organosfosfato hidrolases (BAPAT e colab., 2016).

Nanopartículas de TiO_2 ($\text{TiO}_2\text{ NPs}$), são usadas tanto para armazenamento de energia, como para toxicidade em bactérias. Pesquisas recentes também mostraram sua utilização para desenvolvimento de biosensores ópticos baseado em fotoluminescência, para detecção de Salmonela (SHAO e colab., 2017).

As nanopartículas de Ag (AgNPs), além de propriedades de absorção de luz visível, possuem uma alta eficiência bactericida. Pesquisas mostraram que AgNPs isoladas de *Corchorus Capsularis* (fibra têxtil conhecida como Juta no Brasil) foram extremamente tóxicas contra o *Staphylococcus* resistentes a fármacos e isolados de feridas pós-cirúrgica, podendo em um futuro serem utilizadas na produção de curativos para cicatrização (KASITHEVAR e colab., 2017).

Já as nanopartículas de Au (AuNPs) são uma das que possuem mais trabalhos publicados na comunidade científica. Essas dotam de propriedades multivalentes com aplicações multidisciplinares, transitando entre áreas da engenharia dos materiais e ciências biológicas.

2.1.1. Nanopartículas de ouro

Os Incas (civilização pré-colombiana, atual Peru), referiam-se ao ouro como “lágrimas do sol”, tendo ele um grande valor religioso para a civilização. Entretanto, o ouro (do latim *aurum*, “brilhante”) é um elemento químico, possuindo número atômico 79 *u*, massa atômica 197 *u* e está situado no grupo IB da tabela periódica, pertencendo aos materiais metálicos. Durante a formação do nosso planeta, boa parte desse elemento foi concentrado no núcleo da terra, devido sua alta densidade e comportamento geoquímico altamente siderófilo, que é a capacidade que os metais possuem de se ligarem a outros metais. Estima-se que 98% de todo o ouro esteja no núcleo da terra (FRIMMEL, 2018).

O ouro é um dos metais mais maleáveis, sendo dúctil, denso, condutor e brilhante, características que as tornaram desejada por boa parte da história humana. Talvez o uso mais famoso do ouro seja o de armazenar, riqueza possuindo mercado ativo por mais de 6.000 anos

(O'CONNOR e colab., 2015). Em 3.000 a.C. esse metal brilhante já era usado na Suméria (antiga civilização chamada de “terra de reis civilizados” localizada no sul da Mesopotâmia atual sul do Iraque) nas várias formas de confecção de joias. No Egito em 1.400 a.C. ele já era usado como padrão monetário. Essa herança histórica é tão forte que até hoje, o ouro é negociado em sete mercados: London OTC, COMEX (Nova York), as três bolsas de Xangai, TOCOM (Tóquio), MCX (Índia), Dubai e Istambul (O'CONNOR e colab., 2015).

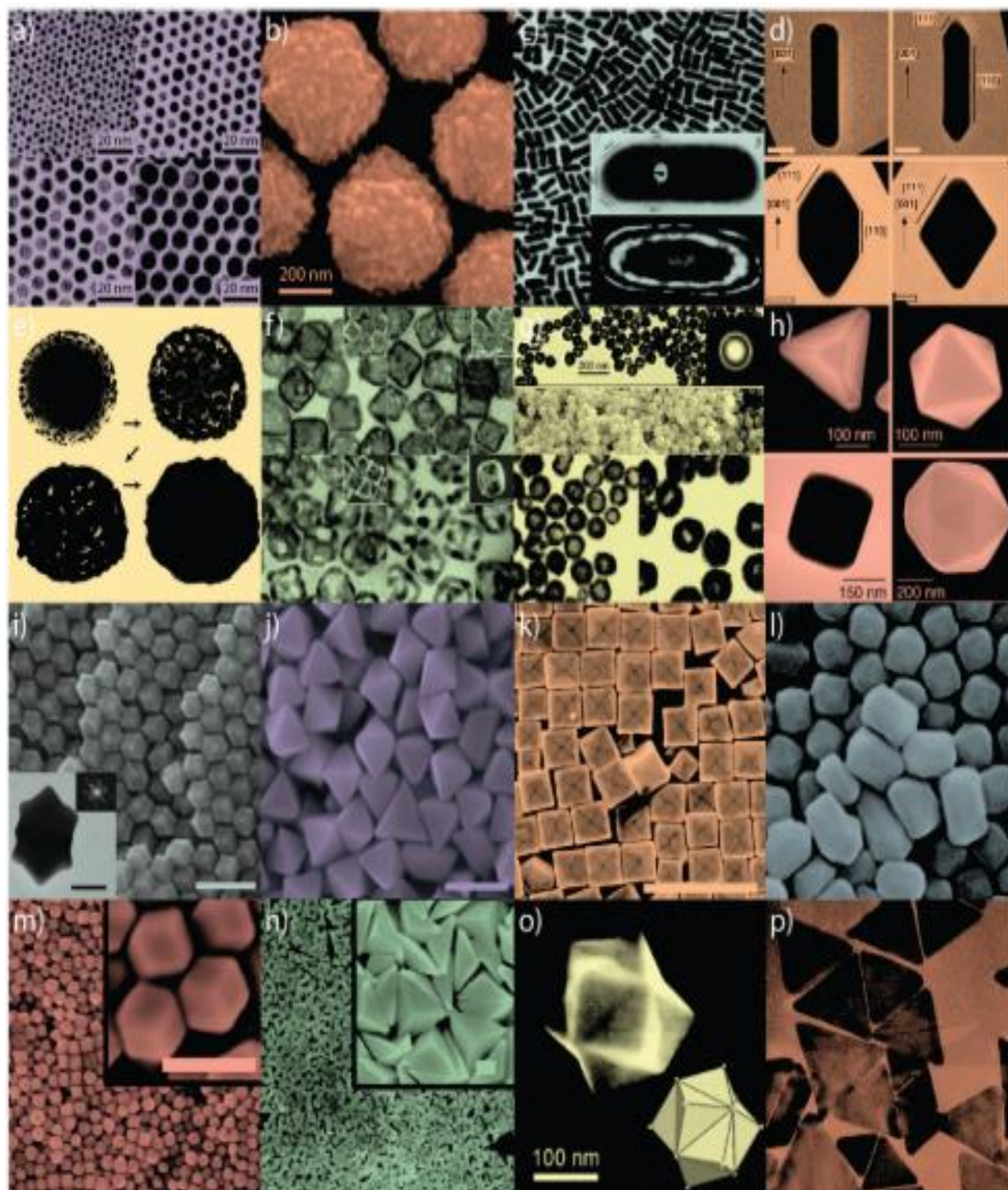
Na medicina o ouro possui registros de utilização desde 5.000 a.C. no Egito. Utilizado em diversas situações: na odontologia com implantes dentários e restaurações de dentaduras, em pomadas para tratamento de úlceras na pele, em pó misturados nas bebidas para confortar dores causadas por artrite. Esse último com comprovações científicas em vários artigos (GUL e colab., 2018; ZHAO e colab., 2018).

O alemão Robert Koch marcou a utilização do ouro na forma de nanopartícula na ciência atual, ganhando o prêmio Nobel de fisiologia e medicina em 1905 por sua investigação e descoberta com sua relação com a tuberculose. Em suas investigações Koch descobriu a natureza bacteriostática do cianeto de ouro em um estudo *in vitro* sobre o *bacillus* da tuberculose (AHMAD e colab., 2017; KAUFMANN, 2005).

Após a descoberta de Koch descobriu-se que as nanopartículas de ouro (AuNPs), possuem propriedades ópticas que as tornam singulares e bastante interessantes na área biomédica e biotecnológica. Essas mudam de acordo com sua forma e tamanho, tendo diferentes relações de superfície-volume, que proporcionam distintas propriedades. Em uma variação de 1 nm à 100 nm sua coloração muda de laranja, vermelha a purpura (ELAHI e colab., 2018). Essas características, associada a uma excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade faz com que as AuNPs sejam uma grande ferramenta para interdisciplinaridade entre biologia e ciência dos materiais.

Com a evolução da forma de sintetização das AuNPs, podendo serem atualmente sintetizadas de várias formas e tamanhos, como é mostrado na figura 2. A quantidade de publicações na comunidade científica relacionada a AuNPs teve um crescimento exponencial. As aplicações mais citadas na utilização de AuNPs na área biotecnológica foram: terapia fototérmica, terapia fotodinâmica, imagem de raio-X e *drug delivery* (ELAHI e colab., 2018). Sendo as nanopartículas esféricas e na forma de nanotubos as mais utilizadas.

Figura 2: AuNPs com vários tamanhos e formatos, com potenciais aplicações na biotecnologia. a) Nanopartículas esféricas de 20 nm; b) Nanopartículas esféricas de 200 nm; c) Nanobastões; d) Nanobastões pontiagudos; e) Nanoconchas; f) Nanoestruturas; g) Nanoesferas ocas; h) Tetraedros/octaedros/cubos/icosaedros; i) Dodecaedros; j) Octaedros; k) Nanocubos côncavos; l) Tetrahexahedros; m) Dodecaedros; n) Bipirâmides; o) Trisoctahedra; p) Nanoprismas.



Fonte: (DREADEN e colab., 2012).

A terapia fototérmica é um método aplicado para doenças oncológicas. AuNPs esféricas de diâmetro maior que 50 nm, possuem absorção de luz na região visível ou próxima ao infravermelho, estas ao receberem luz, geram calor e são levadas até as células tumorais causando assim o processo de ablação térmica (OCHYL e colab., 2018; MISHRA e colab., 2016).

A terapia fotodinâmica é também um tratamento bastante importante para doenças oncológicas, ela consiste em realizar apoptose ou necrose celular em células tumorais, utilizando a AuNPs na forma de esferas ou nanobastões, que cria uma têmpera de fluorescência e ressonância plasmônica na superfície das células (MURPHY e colab., 2010; NARANG e colab., 2015). A ressonância plasmônica é um fenômeno que ocorre em nanopartículas de metais nobres, sendo uma interação entre a luz e a matéria, a luz é uma onda eletromagnética que interagem com os elétrons localizados na banda de valência do metal, esses elétrons ficam em um movimento de “balanço” na banda de valência, causando a ressonância. Esse fenômeno permite a mudança de coloração de materiais nobres.

As nanopartículas de ouro, tanto na sua forma esférica como em nanotubos, também atraíram grande interesse como agente de contraste de raio-X, já que estas possuem um alto coeficiente de absorção dessa gama de luz (MISHRA e colab., 2016).

A capacidade de dispersão controlada, atrelada a uma alta área de superfície faz com que as AuNPs sejam carreadoras eficientes de drogas. As AuNPs são eficientes no transporte de várias moléculas, como: peptídeos, proteínas, plasmídeos de DNA (pDNAs), interferentes de RNA (siRNAs) e agentes quimioterápicos (PENG e MU, 2016). Além de nanopartículas esféricas, pesquisadores estão investigando a possibilidade desse transporte ser feito por nanotubos e coloides de ouro (ELAHI e colab., 2018).

Além da via *in vivo* e *in vitro*, um outro caminho que está em ascensão na pesquisa de AuNPs é a teórica computacional, ou *in silico*. Essa consegue responder perguntas muitas vezes impossíveis de serem respondidas claramente na área experimental.

A modelagem molecular é uma via *in silico* que utiliza a física clássica para encontrar potenciais de energia de interações entre duas moléculas (mecânica molecular (MM)) ou encontrar o tempo dessa interação (dinâmica molecular (DM)).

Na MM é possível a construção e adoção de diferentes parâmetros físico químicos de AuNPs, interagindo com as mais diversas moléculas biológicas, encontrando respostas de sítios de ligação ou energia de interação difíceis de serem previstas em pesquisas experimentais.

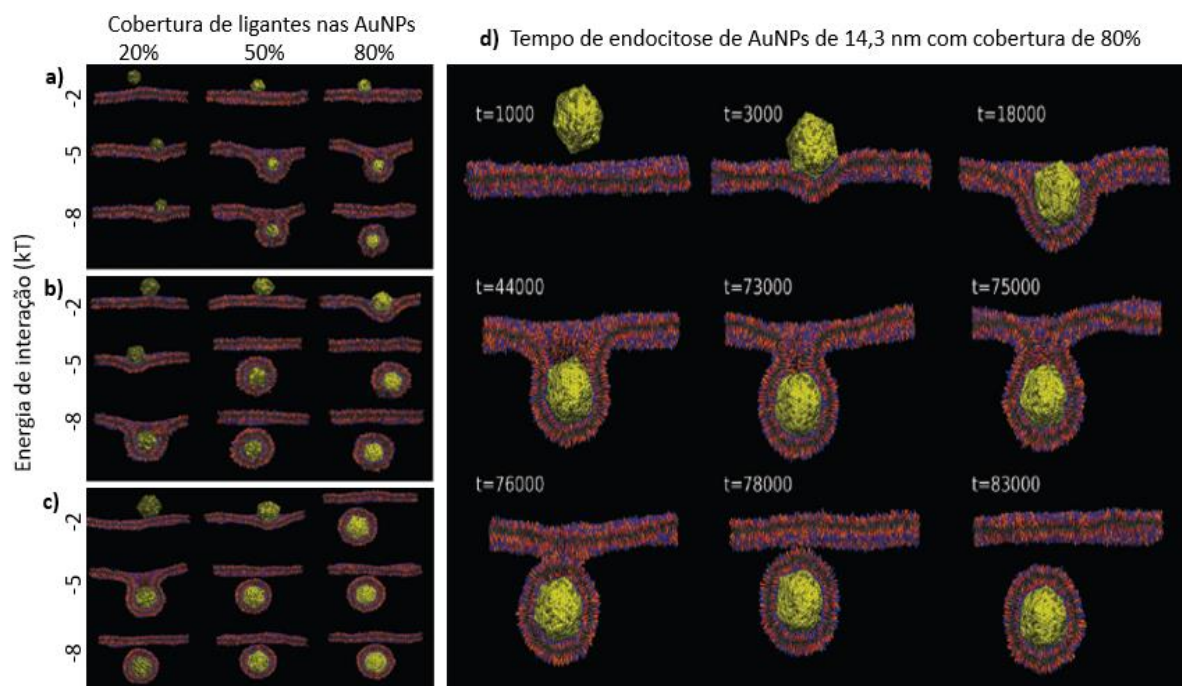
Uma das principais funções das AuNPs quando entra no plasma sanguíneo é chegar até a célula em questão e entrar na membrana celular, via endocitose, tanto para um processo de terapia fototérmica, fotodinâmica ou como um processo de *drug delivery*. Logo, uma questão inicial importante, é como diferentes tamanhos, formas e cargas de AuNPs afetam na endocitose realizada pelas membranas celulares (ANGIOLETTI-UBERTI, 2017).

Os pesquisadores Vácha et al., (2011), realizaram DM com preocupações no tamanho, forma e superfície das AuNPs. Na pesquisa, foram modeladas AuNPs esféricas e esferocilíndricas. As AuNPs esféricas foram modeladas com os tamanhos 5,7 nm, 8,6 nm e 14,3 nm de diâmetro e com coberturas superficiais de pequenas moléculas presentes na água de 20, 50 e 80%, posteriormente foram colocadas para interagir com simples camadas fosfolípicas com três forças de interação diferentes -2 , -5 e $-8 kT$. As interações de DM das AuNPs esféricas mostraram que nanopartículas maiores e com maiores percentuais de recobrimento superficial são as que realizam o processo de endocitose mais rapidamente pelas células, não tendo a força de interação como fator de influência quando o tamanho é de 14,3 nm e o recobrimento é de 80%. Esse fato pode ser explicado por uma maior facilidade de interação de moléculas da membrana plasmática, devido um maior tamanho superficial.

Os pesquisadores Vácha et al., (2011) também simularam o tempo de endocitose das AuNPs de 14,3 nm e com cobertura de 80%, chegando a um tempo de 83000 ns. A figura 3 exemplifica os resultados (VÁCHA e colab., 2011).

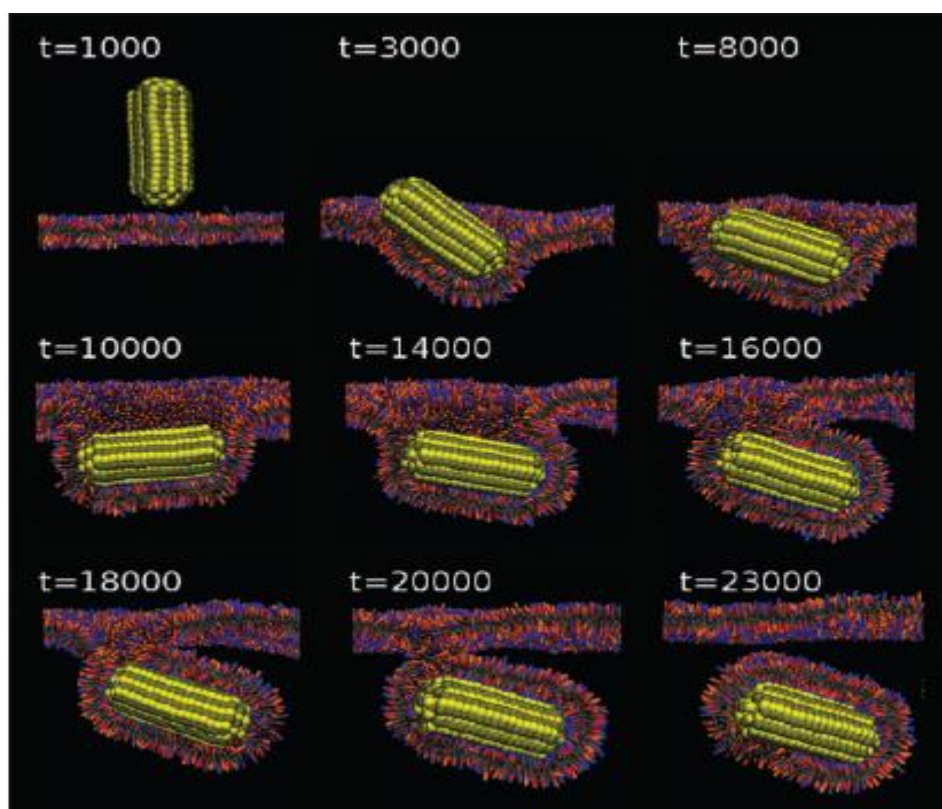
Nas AuNPs esferocilíndricas os pesquisadores apenas calcularam o tempo de endocitose que ocorre para nanopartículas com diâmetro de 8 nm e altura de 16 nm, força de interação de $-5 kT$ e percentual de cobertura de 50%. Nessa simulação foi encontrado um tempo de endocitose de 23000 ns, sendo um tempo menor que o encontrado para a melhor situação de uma AuNPs esférica, fato que pode ser explicado mais uma vez pelo aumento de interações superficiais entre nanopartícula e camadas fosfolípicas, a figura 4 mostra os resultados para a simulação de AuNPs esferocilíndricas (VÁCHA e colab., 2011).

Figura 3: a) DM de AuNPs de **5,7 nm**. b) DM de AuNPs de **8,6 nm**. c) DM de AuNPs de **14,3 nm**. d) DM da melhor situação de endocitose em AuNPs esféricas de **14,3 nm**.



Fonte: (VÁCHA e colab., 2011).

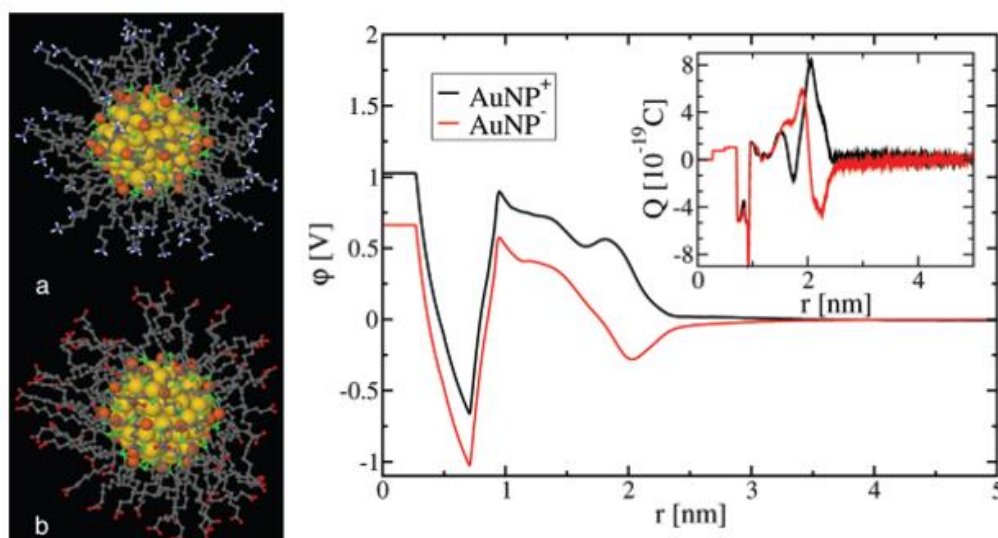
Figura 4: DM de AuNPs esferocilíndricas com **50%** de cobertura superficial e energia de interação de **-5 kT**.



Fonte: (VÁCHA e colab., 2011).

Pesquisas realizadas por Heikkilä et al., (2012) via MM estudaram a influência do tamanho das AuNPs na distribuição de cargas e na passagem de membranas celulares. Os pesquisadores modelaram AuNPs catiônicas e aniônicas quase esféricas variando de 1 à 10 nm de diâmetro, colocaram em meio solvatado por água e as interagiram com membranas celulares (HEIKKILÄ e colab., 2012; ROSSI e MONTICELLI, 2016). Um dos resultados principais, mostraram que há uma diferença significativa no potencial eletrostático em nanopartículas de até 4 nm de diâmetro, mas que desse tamanho em diante a influência do tamanho é predominante na endocitose das nanopartículas pelas células, já que o potencial eletrostático entra em convergência (HEIKKILÄ e colab., 2012; ROSSI e MONTICELLI, 2016). A figura 5 demonstra exemplifica a pesquisa realizada por Heikkilä et al., (2012).

Figura 5: Influência da carga na endocitose de AuNPs por membranas celulares.



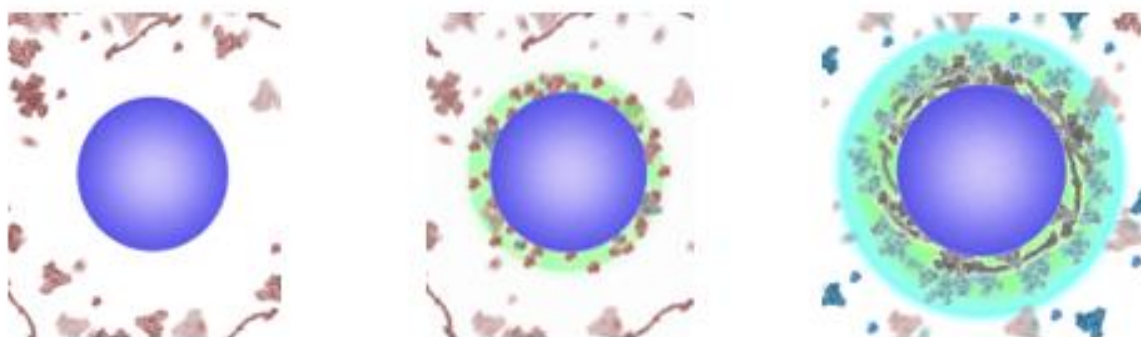
Fonte: (HEIKKILÄ e colab., 2012).

As figuras 3, 4 e 5 mostraram uma pequena parcela dos diversos trabalhos que estão sendo publicados a respeito da interação de AuNPs com moléculas biológicas utilizando como ferramenta a modelagem molecular. Embora muitas respostas de como as nanopartículas conseguem adentrar nas células biológicas estejam sendo resolvidas nessa via teórica, uma outra problemática vem aparecendo na via experimental, o efeito corona. Quando nanopartículas com alta biocompatibilidade, caso das AuNPs, entram no plasma sanguíneo, proteínas presentes nesse plasma interagem com elas formando uma espécie de coroa de proteínas em sua superfície, criando efeitos imprevisíveis que podem atrapalhar na finalidade terapêutica das nanopartículas.

2.2. EFEITO CORONA

Diversas nanopartículas (NP) biocompatíveis, como ZnONPs, SiO₂NPs, TiO₂NPs, AgNPs e AuNPs, são vulneráveis a interagirem com qualquer molécula biológica presente no plasma sanguíneo. Esse fato, faz com que sua real função ao ser injetada na corrente sanguínea, seja interrompida por associações e adsorções com moléculas biológicas, causando um fenômeno chamado de efeito corona, figura 6. Quando as moléculas que adsorvem na superfície da NP são predominantemente proteínas, temos o efeito da Proteína Corona (PC).

Figura 6: Formação do efeito corona em NP biocompatíveis.



Fonte: (adaptado de ZHDANOV, 2018).

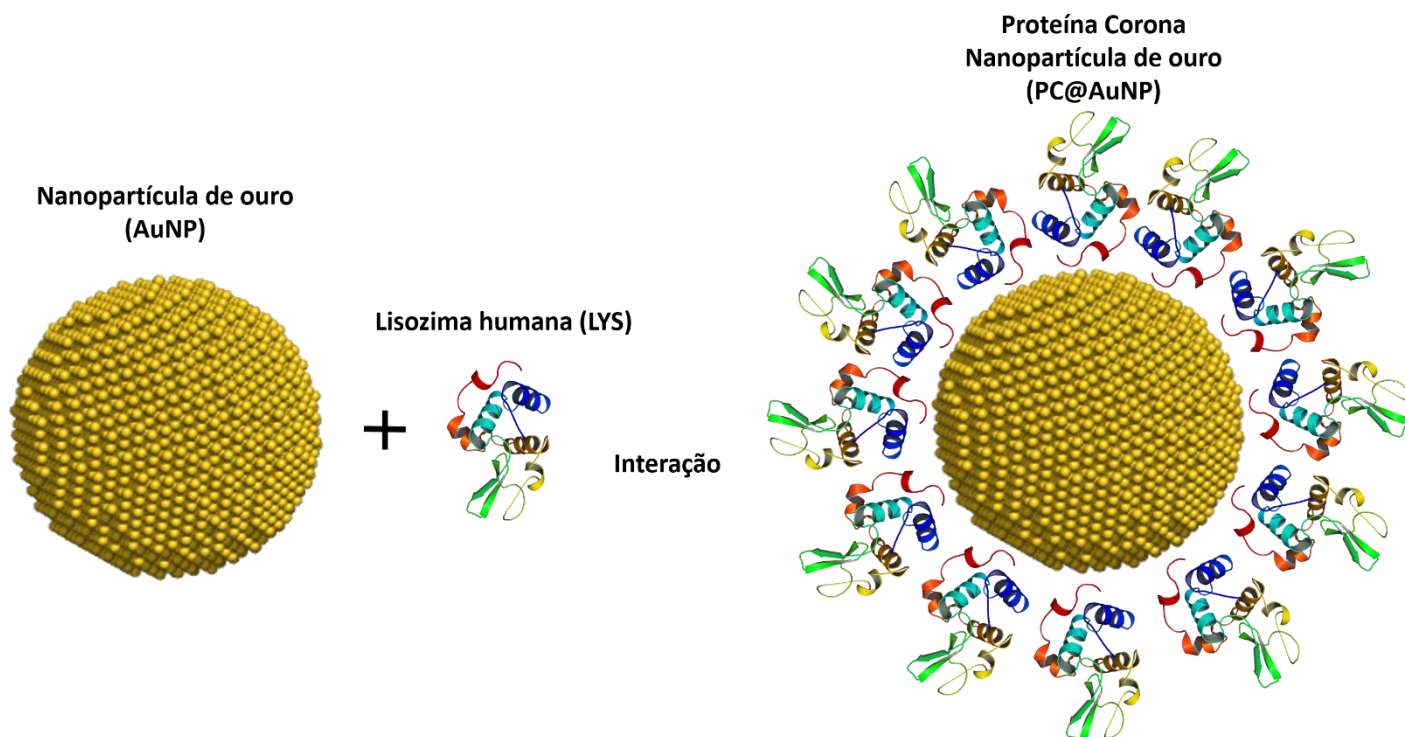
Além da biocompatibilidade, diversos são os motivos da interação de proteínas com as superfícies de nanopartículas. Cada NP possui sua particularidade, na velocidade de formação, afinidade de superfície e interações que envolvem as proteínas que mais formam a PC (ZHDANOV, 2018). Muitos artigos estão sendo publicados na comunidade científica a fim de entender a formação da PC em cada NP susceptível a esse fenômeno (CARRILLO-CARRION e colab., 2017). Até o presente momento o que se sabe é que uma vez formada a PC os efeitos terapêuticos na qual as NPs possuíam tornam-se imprevisíveis. A interação para formação da PC é um processo dinâmico e competitivo, uma proteína presente no plasma pode associar-se na nanopartícula, e rapidamente desassociar-se deixando uma vaga na superfície que é rapidamente preenchida por uma outra proteína, causando assim mudanças dinâmicas e aleatórios (KHARAZIAN e colab., 2016).

Por ser um processo dinâmico as proteínas são associadas e dissociadas das NPs constantemente, a cinética desse processo depende da probabilidade de que tal contanto aconteça, bem como a força de interação quando a proteína é associada. Uma interação fraca entre proteína e NP pode a qualquer momento ser dissociada e dá lugar a uma outra proteína,

seja ela com uma ligação mais forte ou não. Esse processo de associação e dissociação é chamado de “efeito *Vroman*”. Esse faz com que a identidade da PC mude ao longo do tempo, mesmo que aja uma taxa de associação e dissociação constante. Com o passar do tempo de interação há uma tendência natural das proteínas que formem ligações mais fortes com as NPs permanecerem associadas, assim o efeito *Vroman* é dividido em dois estágios, o estágio inicial em que há uma maior taxa de associação e dissociação, pois existe parcelas de ligações fracas formadas entre a NP e as proteínas, e o estágio estacionário onde há formação de ligações mais fortes entre as proteínas presentes na superfície da NP, sendo o estágio mais característico da PC (KHARAZIAN e colab., 2016). A parcela de ligações mais fortes formadas na PC dá-se o nome de corona dura, e a parcela de proteínas que formam ligações mais fracas dá-se o nome de corona mole (HARRIS e colab., 2018).

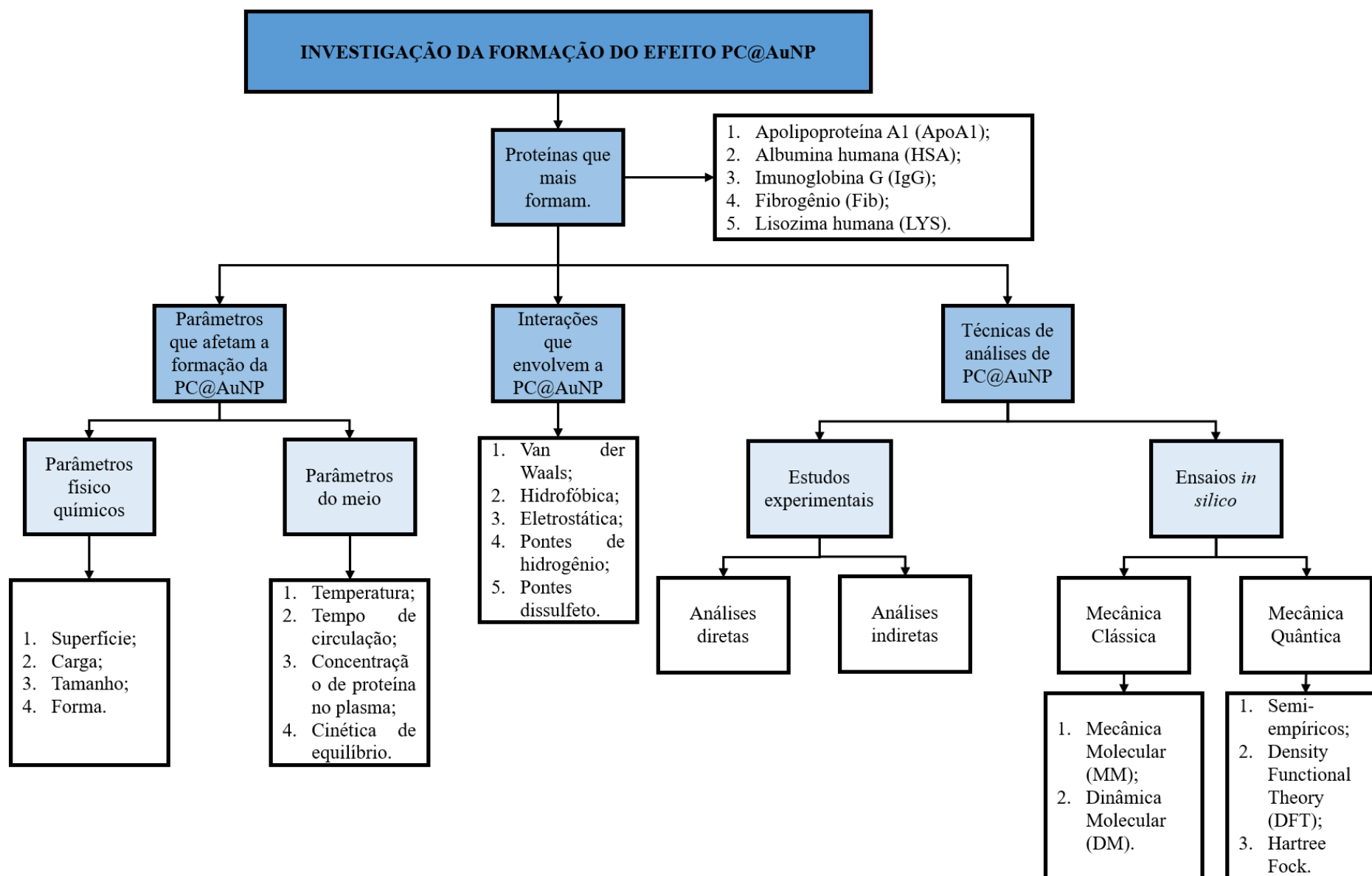
Por mais que diversas NPs sejam susceptíveis a formação da PC, até o presente momento, em pesquisas feitas nos sites de divulgações de artigos *ScienceDirect* e *Web of Science*, a NP mais pesquisada na formação da PC é as AuNPs, a figura 7 exemplifica uma situação hipotética, e a figura 8 mostra um organograma do que seria uma completa investigação da formação do efeito Proteína Corona em nanopartículas de ouro (PC@AuNP).

Figura 7: Formação da PC@AuNP.



Fonte: (AUTOR).

Figura 8: Organograma da investigação do efeito PC@AuNP.



2.3. PROTEÍNAS QUE MAIS FORMAM A PC@AuNP

Sabe-se que mais de 70 proteínas são capazes de formar o PC@AuNP (DOCTER e colab., 2014). Isso leva a competições dinâmicas de proteínas que buscam associar-se as AuNPs. As cinco proteínas que mais associam-se são: apolipoproteína A1 (ApoA1), albumina humana (HSA), imunoglobulina G (IgG), fibrinogênio (Fib), e a lisozima humana (LYZ) (CHARBGOO e colab., 2018; DOCTER e colab., 2014; SASIDHARAN e colab., 2015). Estudos mostram que a ApoA1 foi a que teve a maior afinidade pela superfície das AuNPs seguida do Fib, HSA e IgG respectivamente (CHARBGOO e colab., 2018).

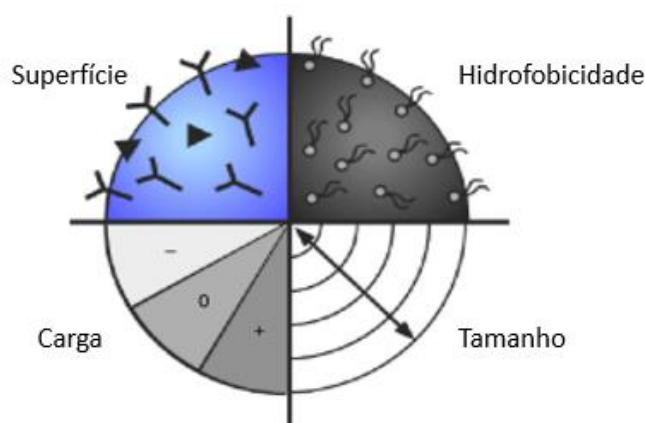
As afinidades dessas proteínas com as AuNPs estão relacionadas a diversos fatores como: quantidade de proteína no plasma sanguíneo, parâmetros físico químicos relacionados a nanopartícula, parâmetros do meio na qual a nanopartícula foi injeta, esta último dita a probabilidade de encontro da proteína com a nanopartícula, que difere do local do corpo humano (CHARBGOO e colab., 2018; KHARAZIAN e colab., 2016).

2.4. PARAMETROS QUE AFETAM A FORMAÇÃO DA PC@AuNP

2.4.1. Parâmetros físico químico

As características físicas das nanopartículas de ouro como: superfície, forma, carga e tamanho, ditam a composição da formação da PC@AuNP (AJDARI e colab., 2017; BRAUN e colab., 2016). Docter et al., (2014) mostra algumas influências na composição da PC de acordo com os fatores físicos mais relevantes, conforme mostra a figura 9.

Figura 9: Parâmetros físico químicos que afetam na formação da PC@AuNP



Fonte: (DOCTER e colab., 2014).

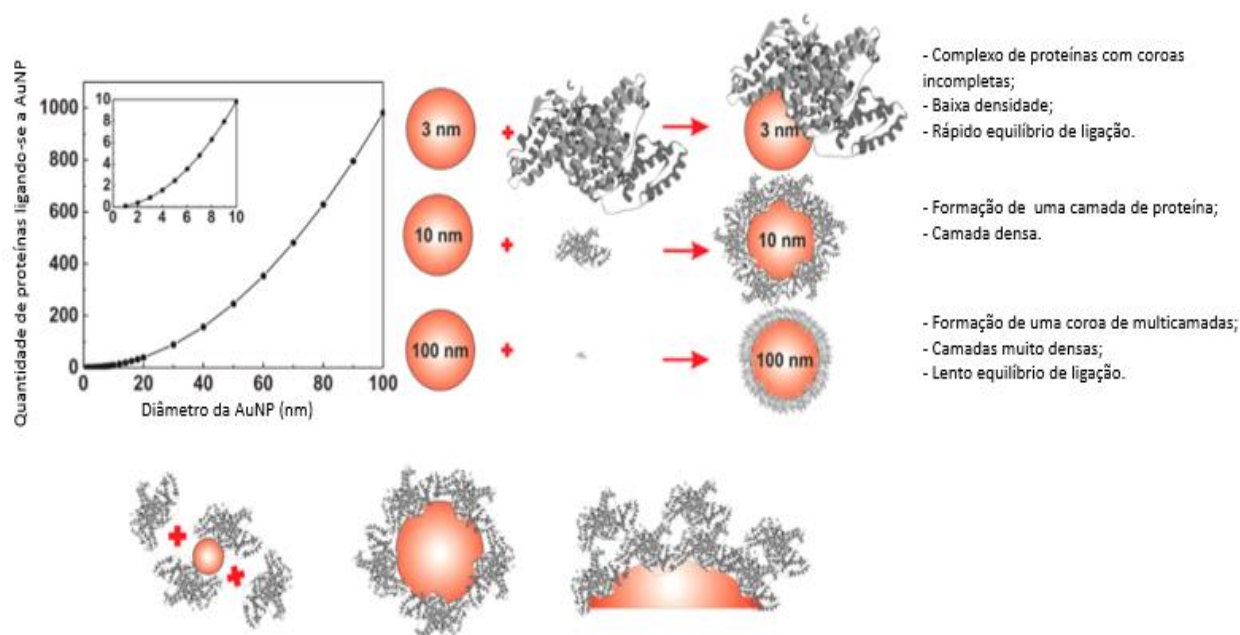
A superfície e a hidrofobicidade das AuNPs afetam a estrutura secundária das proteínas, bem como ditam a espessura e a identidade da PC, podendo gerar ligações que as deixam com a superfície hidrofóbicas, criando caudas de moléculas maiores ou menores (CHARBGOO e colab., 2018).

A carga da nanopartícula influencia na atração de proteínas negativamente ou positivamente carregadas. Trabalhos mostraram que nanopartículas catiônicas atraem proteínas negativamente carregadas que são adsorvidas rapidamente a superfície da nanopartícula, formando a fase inicial da PC, chamada de corona mole (CHARBGOO e colab., 2018).

O tamanho das AuNPs é um dos fatores de maior influência, esse está relacionado diretamente na quantidade de moléculas a se ligarem em sua superfície, já que o aumento do tamanho proporciona uma maior área superficial livre (LIU e PENG, 2017).

Piella et al., (2017) realizaram uma pesquisa experimental em que interagiram diferentes tamanhos de AuNPs com o meio biológico, a fim de identificar os tamanhos de NPs mais prováveis para formação da PC. Em todas as AuNPs testadas foram identificados os processos dinâmicos de associação de proteínas, evoluindo para um revestimento estacionário conhecido como PC, com formações de corona dura. A espessura e a densidade desse revestimento foram fortemente dependentes dos tamanhos das NPs, como é mostrado na figura 10.

Figura 10: Relação do aumento da AuNP na formação da PC@AuNP.



Fonte: (PIELLA e colab., 2017).

Foi possível identificar diferentes regimes de transição a medida que o tamanho das AuNPs aumentaram. Para AuNPs pequenas (3 nm): complexos de proteínas com coroas incompletas, baixa densidade de proteínas e rápido equilíbrio de ligação. Para AuNPs médias (10 nm): formação de uma camada de proteína densa e quase única. Para AuNPs grandes (100 nm): formação de uma coroa de multicamadas, muito densas, mas com lento equilíbrio de ligação (PIELLA e colab., 2017).

2.4.2. Parâmetros do meio

A temperatura, tempo de circulação, gradiente de concentração de proteínas no plasma e a cinética de equilíbrio, são variáveis do meio que podem afetar a composição da formação da PC (CHARBGGO e colab., 2018; DOCTER e colab., 2014).

O meio fisiológico pode mudar completamente em uma variação de temperatura de 35°C para 39°C, sendo este um fator a ser considerado na formação da PC na superfície das AuNPs, principalmente, para estudos que utilizam as AuNPs para terapia de hipertermia (CHARBGGO e colab., 2018). O tempo de circulação das AuNPs no plasma sanguíneo, antes de encontrar seu destino final, fornece a possibilidade de enfrentar vários meios fisiológicos, como fluidos intersticiais e lisossomais levando a formação de agregados que podem se tornarem uma PC de aproximadamente 300 nm, sendo um tamanho de difícil penetração nas membranas celulares (CHARBGGO e colab., 2018). Atrelado ao tempo de circulação, a concentração de proteínas no plasma sanguíneo pode causar uma situação parecida na formação da PC, formando coroas de grandes diâmetros (CHARBGGO e colab., 2018). A cinética de equilíbrio irá interferir na velocidade da formação da PC, esse está relacionado a probabilidade de encontro de proteínas presentes no plasma que sejam susceptíveis a associarem-se a superfície das AuNPs (CHARBGGO e colab., 2018).

2.4. INTERAÇÕES QUE ENVOLVEM A PC@AuNP

Interações físicas, incluindo *van der Waals*, interações eletrostáticas, hidrofóbicas, e as pontes de hidrogênio e dissulfeto preenchem todas as interações que formam as PC (CHARBGGO e colab., 2018). Cada uma dessas interações conseguem ser particular para cada caso de associação de uma proteína específica com uma nanopartícula, entretanto existem relatórios limitados sobre esse assunto (CHAKRABORTI e colab., 2012; CHARBGGO e colab., 2018; WANG, Mengmeng e colab., 2015).

Alguns dados presentes na literatura mostram que interações hidrofóbicas tiveram o papel predominante na associação de HSA e γ -globulinas na superfície de AuNPs, enquanto que forças eletrostáticas impulsionaram a interação de AuNPs com outras proteínas (CHAKRABORTI e colab., 2012; CHARBGOO e colab., 2018; WANG, Mengmeng e colab., 2015).

Uma outra possibilidade de interação, embora não efetivamente investigada, é que as AuNPs poderiam formar pontes de hidrogênio e dissulfeto, entre os grupos de carboxila e amina da proteínas, entretanto alguns autores relatam que as ligações predominantes sejam as interações eletrostáticas (CHAKRABORTI e colab., 2012; CHARBGOO e colab., 2018; WANG, Mengmeng e colab., 2015).

2.5. TECNICAS DE ANÁLISE DE PC@AuNP

2.5.1. Estudos experimentais

Muitos métodos experimentais estão disponíveis para identificar a ligação de NPs com proteínas, bem como PC@AuNP. No método experimental as NPs são basicamente incubadas junto ao plasma sanguíneo, a fim de imitar o meio biológico de uma corrente sanguínea, sendo identificadas em diferentes técnicas. As formas de identificação na experimentação *in vitro* temos os métodos diretos, avaliando estrutura física ou química das NPs e das proteínas com a PC formada ou não, ou indiretos identificando as modificações de propriedades apenas com a PC formada (CARRILLO-CARRION e colab., 2017; KHARAZIAN e colab., 2016).

Os métodos diretos, analisam as proteínas que são adsorvidas diretamente na superfície das nanopartículas. Podendo ser classificados em informações estruturais e de quantificação. As informações estruturais são obtidas quando a PC já está formada, já a análise de quantificação é feita antes da formação (CARRILLO-CARRION e colab., 2017).

A formação da PC também pode ser analisada indiretamente através de alterações que acontecem em suas propriedades com a mudança de: tamanho, absorbância, carga, temperatura, fluorescência e massa (CARRILLO-CARRION e colab., 2017; KHARAZIAN e colab., 2016).

Embora aja diversas técnicas experimentais, existe um desafio analítico em comum, que é isolar o tamanho e geometria específica da nanopartícula, bem como a proteína na qual o pesquisador tem interesse em estudar o efeito PC (CARRILLO-CARRION e colab., 2017).

2.5.2. Estudos *in silico*

Apesar das contribuições importantes vindas das técnicas experimentais sobre o estudo da formação da PC, os princípios físico-químicos subjacentes à adsorção de proteínas nas NPs ainda não são totalmente compreendidos (KHARAZIAN e colab., 2016). As técnicas experimentais possuem algumas desvantagens, como por exemplo, a maioria delas medem apenas um conjunto de proteínas adsorvidas e não conseguem distinguir entre as proteínas individuais.

Já os métodos de modelagem molecular, os estudos *in silico*, permitem determinar o comportamento individual dos sistemas atômicos e moleculares, além de permitir ao pesquisador realizar mudanças de configuração e conformação dos sistemas (KHARAZIAN e colab., 2016).

Os métodos de modelagem molecular que investigam a formação de PC são os métodos *ab initio* da mecânica quântica, investigando interações com uma pequena quantidade de moléculas, e os métodos da mecânica clássica, investigando a formação completa do efeito PC@AuNP. Os algoritmos que regem esses métodos, são a teoria funcional da densidade (do inglês, *Density Functional Theory*, DFT) e o Hartree Fock (HF) para os métodos quânticos, e para os métodos clássicos temos os métodos da mecânica molecular (MM) e a dinâmica molecular (DM) (KHARAZIAN e colab., 2016; MAHMOUDI e colab., 2011).

Os métodos quânticos resolvem aproximações da equação de *Schrodinger*, dando ótimos resultados teóricos, tratam-se de cálculos caros e restritos a algumas dezenas de átomos, sendo uma técnica que ainda não se desenvolveu muito bem para ser aplicado a problemas de PC, já que neste há uma grande quantidade de moléculas envolvidas (KHARAZIAN e colab., 2016).

Os métodos da mecânica molecular (MM) podem ser usados para modelar o comportamento de dezenas de milhares de átomos, atualmente muito aplicado para abordar interações de proteína-superfície (KHARAZIAN e colab., 2016). Esses métodos, basicamente, calculam a energia de interação de um conjunto de moléculas, utilizando de energias associadas aos vínculos das ligações químicas, alongamento, flexão, rotação e as forças intermoleculares como as interações de *van der Waals* e pontes de hidrogênio. A diferença entre um cálculo de campo de força e uma dinâmica molecular (DM), está no fato que na DM calcula-se o comportamento da energia de interação dependente do tempo, ao passo que no cálculo de MM

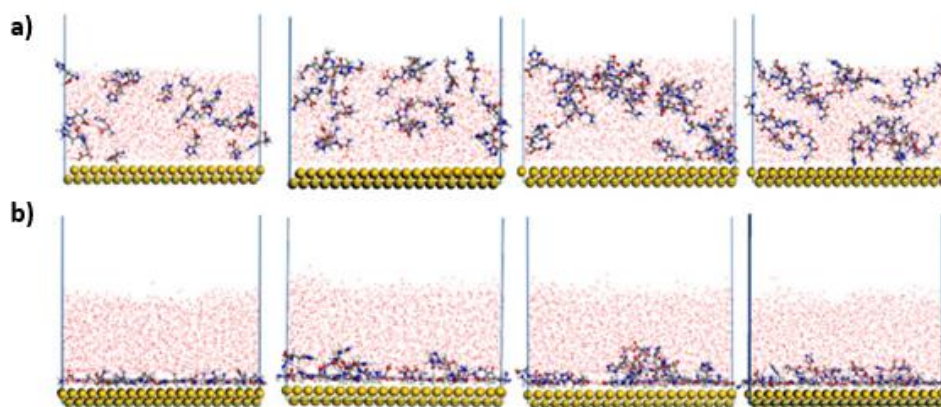
a modelagem preocupa-se apenas com o potencial de energia global que será adquirido ao equilíbrio do sistema.

Um dos primeiros trabalhos computacionais realizados utilizando métodos de MM em interações de AuNPs com aminoácidos, precursor da proteína, foi o de Xu et al., (2011) eles estudaram a adsorção do aminoácido essencial histidina (His) e três peptídeos derivados glicil-histidina (Gly-His), glicil-histidina-glicina (Gly-His-Gly) e glicil-glicil-histidina (Gly-Gly-His) na superfície do ouro, utilizando o método de campos de força semi-empíricos mais a técnica de DM. Na modelagem eles verificaram a energia de interação de adsorção e comprovaram que peptídeos derivados da His são facilmente adsorvidos pela superfície do ouro, tendo como grupamento ligante os grupos amino e ácido carboxílicos (XU e colab., 2011).

Na DM realizada por Xu et al., (2011), construiu-se uma caixa com as dimensões $x = 57,6 \text{ \AA}$, $y = 57,6 \text{ \AA}$ e $z = 102,3 \text{ \AA}$, nela foi colocada a His e os três peptídeos Gly-His, Gly-His-Gly e Gly-Gly-His, e 2000 moléculas de água. Após esse processo foi construído uma superfície de Au com aproximadamente 800 átomos, com isso a DM foi executada e teve como resultado uma adsorção preferencial da His em um tempo de 3 ns , como é mostrado na figura 11 (XU e colab., 2011).

Ding e Ma, (2014) realizaram tanto uma MM quanto uma DM, na pesquisa eles interagiram AuNPs com albumina do soro humano (HSA). No trabalho eles analisaram os a relação dos parâmetros físico químicos da NP com os parâmetros do meio à qual ela está envolvida (DING e MA, 2014).

Figura 11: Dinâmica molecular da energia de interação de aminoácidos com a superfície do ouro a) Início da simulação $t = 0 \text{ ns}$. b) Final da simulação $t = 3 \text{ ns}$.

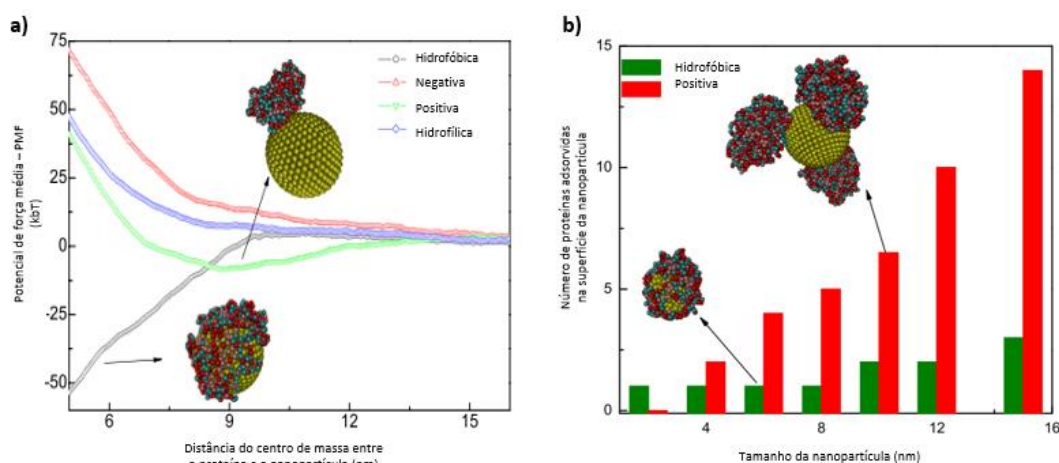


Fonte: (XU e colab., 2011).

Na MM os pesquisadores, primeiramente, simularam as condições de NPs hidrofóbicas, hidrofílicas, positivas e negativas, e obtiveram resultados de uma maior energia de interação para as situações positivas e hidrofóbicas, resultado que já tinha sido obtido experimentalmente (DING e MA, 2014; WANG, Wei e colab., 2010). Posteriormente, ainda na MM, os pesquisadores variaram o tamanho das nanopartículas de 2 nm a 16 nm, mostrando que existe uma formação diferenciada de proteína corona em situações hidrofóbicas, positiva e em tamanhos diferentes. Foi demonstrado o que já era conhecido experimentalmente, que em situações hidrofóbicas há uma maior possibilidade de formação de proteína corona com poucas proteínas, e que essa possibilidade aumenta à medida que é aumentada o tamanho da nanopartícula. Também foi demonstrado que em situações que a nanopartícula é carregada positivamente, há uma maior possibilidade de formação do efeito corona, e que essa possibilidade aumenta à medida que o tamanho da nanopartícula aumenta, figura 12 (DING e MA, 2014; WANG, Wei e colab., 2010).

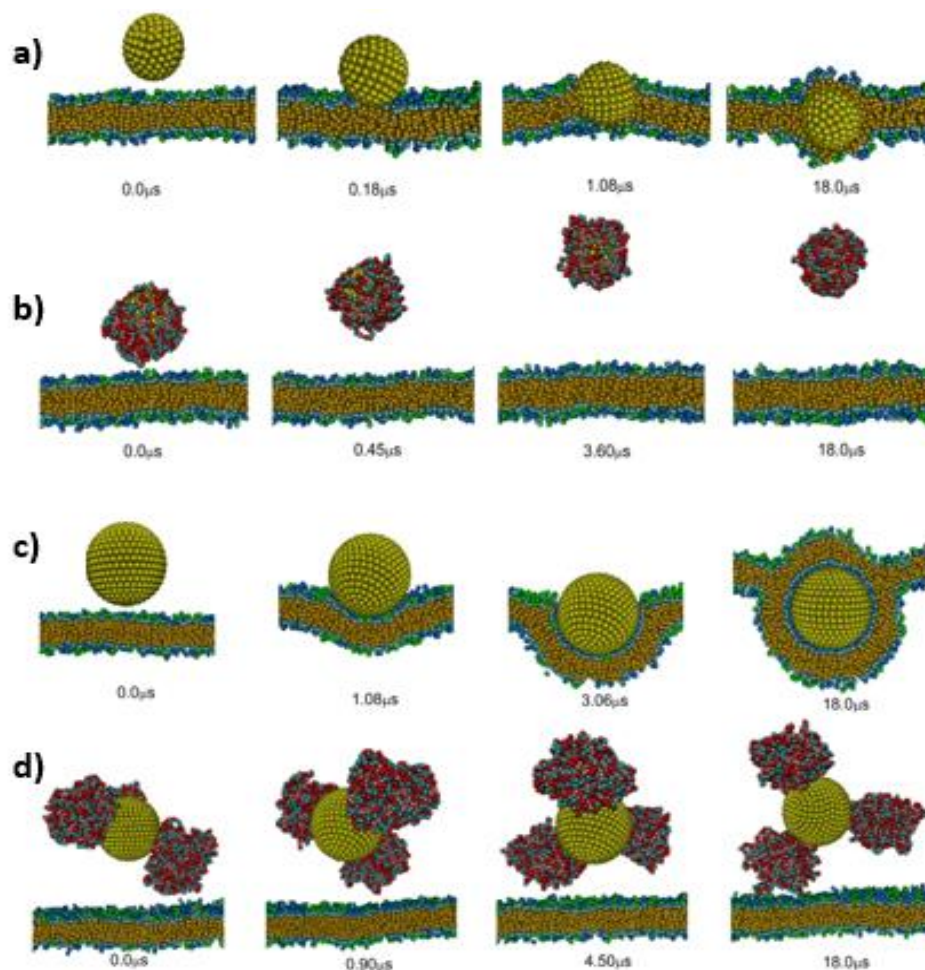
Na DM os pesquisadores Ding e Ma, (2014), trabalharam no sentido de encontrar a relação da entrega de fármaco de uma nanopartícula quando sob o efeito corona. Para a DM os pesquisadores utilizaram dos dados advindos da MM realizada, ou seja, testaram duas hipóteses, nanopartículas menores, utilizaram a de 3 nm, e hidrofóbicas e nanopartículas maiores, 5 nm, e positivas. Resumidamente, foi mostrado que em um tempo de 18 μ s nenhuma nanopartícula que esteja encapsulada por HSA consegue entrar na membrana plasmática de uma célula, figura 13 (DING e MA, 2014).

Figura 12: Modelagem molecular da interação de nanopartículas de ouro com HSA. a) PMF da interação de nanopartículas: hidrofóbicas, hidrofílicas, negativas e positivas. b) Quantidade de adsorção de HSA na superfície de nanopartículas de ouro.



Fonte: (DING e MA, 2014).

Figura 13: Dinâmica molecular da entrada de nanopartículas com efeito corona em uma membrana plasmática. a) e b) nanopartículas de 3 nm hidrofóbicas. c) e d) nanopartículas de 5 nm com carga positiva.



Fonte: (DING e MA, 2014).

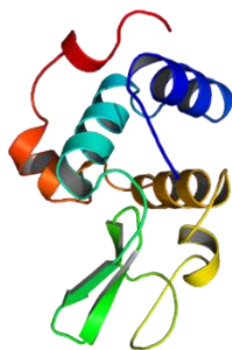
2.6. PROTEÍNAS

Aminoácidos são compostos contendo carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S), sua estrutura geral envolve um grupo amina (NH_2) e um grupo carboxílico ($-\text{COOH}$), ligados a um carbono central chamado de alfa, além disso o carbono é ligado por um grupamento R que determina a identidade do aminoácido e das proteínas. As proteínas são conjuntos de no máximo 20 tipos de aminoácidos formados a partir de suas cadeias comuns e unidos através de ligações peptídicas que são formadas entre o grupamento amina de um aminoácido e um grupamento carboxílico de outro, como as proteínas são formadas por muitas ligações peptídicas elas são chamadas de macromoléculas polipeptídicas. Essas cadeias peptídicas são recombinadas e determinam a estrutura tridimensional da proteína, que por sua vez dita sua função.

2.6.1. Lisoizima humana

A lisoizima (LYS) é uma das proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo humano, sendo uma enzima que tem como principal função quebrar carboidratos de alto peso molecular, essa também pode ser chamada como antibiótico natural, pois também é capaz de hidrolisar paredes celulares bacterianas. A LYS é um polipeptídeo elipsoidal, de cadeia única, com peso molecular de 14,3 *kDa*, contendo 130 aminoácidos, sendo 8 aminoácidos de cisteína (Cys), que participam do sítio ativo e ligações dissulfetos. A LYS tem dimensões de aproximadamente 45 x 30 x 30 Å (ANTONOV e colab., 2018; BHAT e colab., 2018). A figura 14, mostra a representação da LYS, com sua estrutura isolada por Durek T. et al (2006), e depositada no *Protein Data Bank* (PDB), sob código 2nwd.

Figura 14: Estrutura terciária da lisoizima, 2nwd.



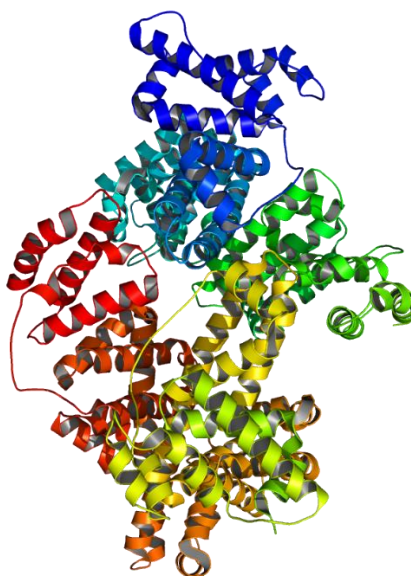
Fonte: (DUREK T. et al., 2006).

2.6.2. Albumina humana

A albumina do soro humano (HSA) é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, possuindo funções fisiológicas importantes, como regulação da pressão osmótica, transporte de compostos, hormônios, ácidos biliares, metais, entre tantos outros. A HSA é um polipeptídico helicoidal, de cadeia única, com peso molecular 66,5 *kDa*, contendo 585 aminoácidos e com dimensões de aproximadamente 80 x 80 x 30 Å (YANG e colab., 2014).

A HSA revela uma estrutura com três domínios, domínio I (1-195), II (196-383) e III (383-585), com sequências e topologias idênticas. Os três domínios são divididos em subdomínios A e B. Além disso a HSA possui 35 resíduos de cisteína (Cys), que estão envolvidos em ligações dissulfeto estabilizando a estrutura da HSA, com exceção da Cys34 no domínio I (YANG e colab., 2014). A figura 15, mostra a estrutura global da HSA, tendo PDB 4k2c, isolada por Yang e colab (2014).

Figura 15: Estrutura terciária da albumina, 4k2c.



Fonte: (YANG e colab., 2014).

2.7. MODELALAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular, segundo a IUPAC, consiste em uma investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica a fim de encontrar valores físico-químicos reais ou próximo deles. Todos os métodos teóricos são englobados pela modelagem molecular, sendo divididos em clássicos e quânticos. A diferença entre uma modelagem clássica e quântica está na proximidade do valor real encontrado, sendo o quântico mais próximo dos valores reais, já que de fato essas são as leis físicas que regem. A modelagem clássica não está em desuso, sua utilização está em sistemas de macromoléculas, como por exemplo proteínas que possuem centenas de átomos. Diversas são as ramificações de cálculos teóricos que podem ter um alto custo computacional a depender da interação matemática envolvida (CARVALHO e colab., 2003; SANT'ANNA, 2009).

Os métodos clássicos da modelagem molecular incluem a mecânica molecular (MM) e a dinâmica molecular (DM), os métodos quânticos incluem cálculos semi-empíricos e cálculos *ab initio* que possuem formas particulares de resolução como o Hartree-Fock (HF), a teoria da densidade funcional (do inglês, *Density Functional Theory*, DFT), entre outros (CARVALHO e colab., 2003; SANT'ANNA, 2009).

A modelagem molecular, também chamada de física ou química computacional, possui a grande vantagem de economizar tempo de pesquisa experimental, tendo grandes aplicações nas ciências dos materiais, bem como na física, química e biologia, sendo capaz de calcular propriedades de moléculas individuais e associadas como: geometrias, energia e propriedades eletrônicas, além de prever comportamentos dinâmicos das moléculas de interesse (CARVALHO e colab., 2003; SANT'ANNA, 2009).

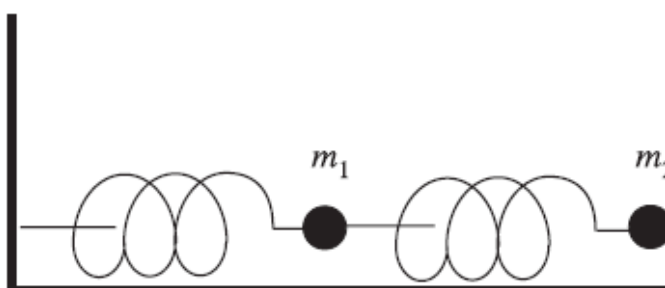
2.8. MECÂNICA MOLECULAR

Sabemos pela mecânica quântica que as moléculas são conjuntos de nuvens eletrônicas que compartilham elétrons através de camadas. Na mecânica molecular, eles são considerados conjuntos sólidos de átomos interligados. Essa consideração promove uma simplificação significativa de cálculos matemáticos, nos permitindo realizar modelagens moleculares com uma maior quantidade de átomos (HINCHLIFFE, 2003).

O modelo da mecânica molecular respeita um conjunto de interações da mecânica clássica que juntas são consideradas como um campo de força, permitindo uma convergência considerável de resultados com dados experimentais. Na formação do campo de força na modelagem molecular, considera-se as interações de alongamento de ligações, torção das ligações, movimentação dos átomos referentes aos diedros das ligações, inversão de ângulo das ligações, interações não vinculadas (*van der Waals*) e interações eletromagnéticas de *Coulomb* (HINCHLIFFE, 2003).

Considere a figura 16 como a representação da ligação entre dois átomos, sendo m_1 e m_2 átomos, que entre eles possui uma mola como representação de uma ligação química

Figura 16: Representação esquemática para demonstração da lei de Hooke.



Fonte: (HINCHLIFFE, 2003).

Para encontrarmos a força de interação de uma situação como mostra a figura 16, aplicamos a lei de Hooke, e se quisermos a energia potencial de interação realizamos a derivada de primeira ordem de acordo com a posição na qual o átomo se encontra. Como é mostrado nas equações 1 e 2.

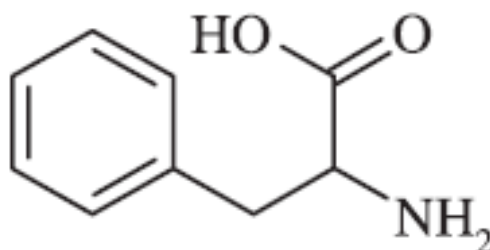
$$F(x) = kx \quad (1)$$

$$U(x) = \frac{1}{2}kx^2 \quad (2)$$

onde, F é a força de interação entre as duas massas m_1 e m_2 , k é a constante da mola, ou a constante da ligação, x é a distância entre as massas m_1 e m_2 , U é a energia de interação, sendo a derivada primeira da $F(x)$.

Levando essa abordagem para uma situação de uma molécula real, considere como exemplo a molécula da fenilalanina representada na figura 17.

Figura 17: Representação esquemática da fenilalanina para demonstração da energia de interação por alongamento de ligações.



Fonte: (HINCHLIFFE, 2003).

Em uma situação como essa, cada átomo é assumido como uma massa e cada ligação como uma mola, como foi mostrado na figura 16, dessa forma, considerando o alongamento de cada átomo sendo de um átomo A para um átomo B, temos a energia potencial de alongamento de ligação como mostrada na equação 3.

$$U_{\text{alongamento}} = \frac{1}{2}k_{AB}(R_{AB} - R_{e,AB})^2 \quad (3)$$

onde, R_{AB} é a posição inicial do átomo e $R_{e,AB}$ é sua posição após o deslocamento.

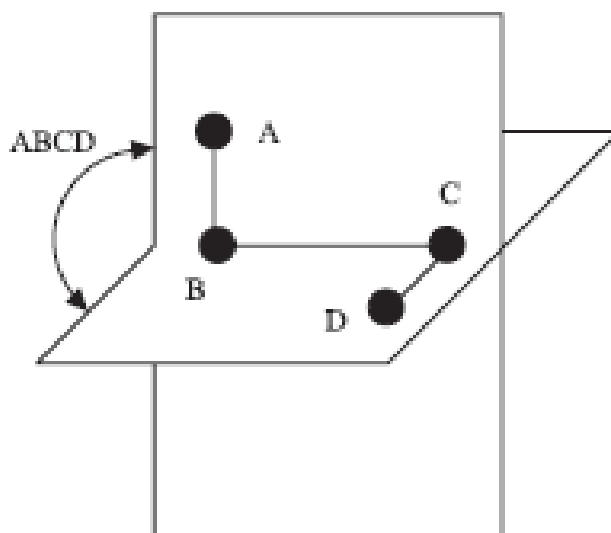
Podemos utilizar dessa mesma demonstração e definir a energia de interação dos átomos referente a torção que esse sofre, como mostra equação 4.

$$U_{\text{torção}} = \frac{1}{2} k_{AB} (\theta_{AB} - \theta_{e,AB})^2 \quad (4)$$

onde θ_{AB} é o ângulo inicial de referência entre os átomos e $\theta_{e,AB}$ é o ângulo formado após uma torção.

Para adicionar a contribuição da movimentação dos átomos referente aos diedros, considere a figura 18, nela representamos quatro átomos qualquer. Quando esses átomos fazem uma rotação de 90° eles mudam suas referências diedras, saindo de uma posição *cis* para uma posição *trans*.

Figura 18: Representação da inversão de diedros em uma molécula.



Fonte: (HINCHLIFFE, 2003).

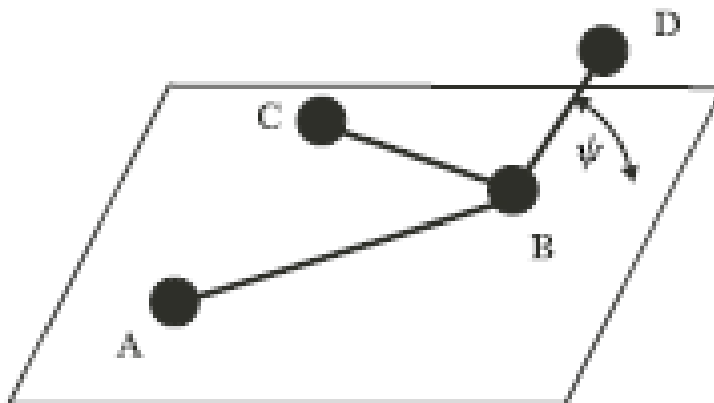
Essa mudança de diedros gera uma contribuição para energia de interação das moléculas mostrada na equação 5.

$$U_{\text{diedros}} = \frac{U_o}{2} (1 - \cos(n(X - X_e))) \quad (5)$$

onde, U_o é a energia de interação inicial, n é a periodicidade que essa mudança acontece, X é a posição de um átomo referente a todos os outros átomos que sobraram, ou seja, se tivermos avaliando o átomo A é sua posição referente aos átomos BCD, X_e é sua posição após a movimentação.

Uma outra contribuição referente a ângulos da energia de interação para uma modelagem molecular de campo de força é a inversão do ângulo da ligação, podemos representa-la como é mostrado na figura 19.

Figura 19: Representação da inversão ângulos em uma molécula.



Fonte: (HINCHLIFFE, 2003).

Considere que o átomo D tenha uma mudança de ângulo, referente aos outros átomos, mas essa mudança não altera seu diedro, logo podemos representar essa contribuição como é mostrada na equação 6.

$$U_{\text{inversão}} = \frac{k}{2 \sin^2 \psi_e} (\cos \psi - \cos \psi_e)^2 \quad (6)$$

Quando as moléculas interagem entre si sem ainda haver uma ligação química forte formada, há uma contribuição para energia de interação chamada de contribuição não vinculada, essas geralmente são consideradas do tipo Lennard-Jones, que são forças atrativas de grande distancias, porém fracas, chamadas de interação de *van der Waals*. Sua contribuição é dada como mostra a equação 7.

$$U_{\text{van der Waals}} = \left(\frac{C_A}{R_A} \right)^{12} - \left(\frac{C_B}{R_B} \right)^6 \quad (7)$$

onde C representa a interação dipolo-dipolo e R a distância entre as moléculas.

A última contribuição para geração do campo de força através de energias de interações das moléculas é a interação de *Coloumb*, que levam em conta a diferença de eletronegatividade entre os átomos. Sua contribuição é mostrada na equação 8.

$$U_{\text{Coulomb}} = \frac{1}{4\pi\epsilon_o} \left(\frac{Q_A Q_B}{R_{AB}} \right) \quad (8)$$

onde Q é a carga elétrica de cada átomo e ϵ_o é a constante elétrica.

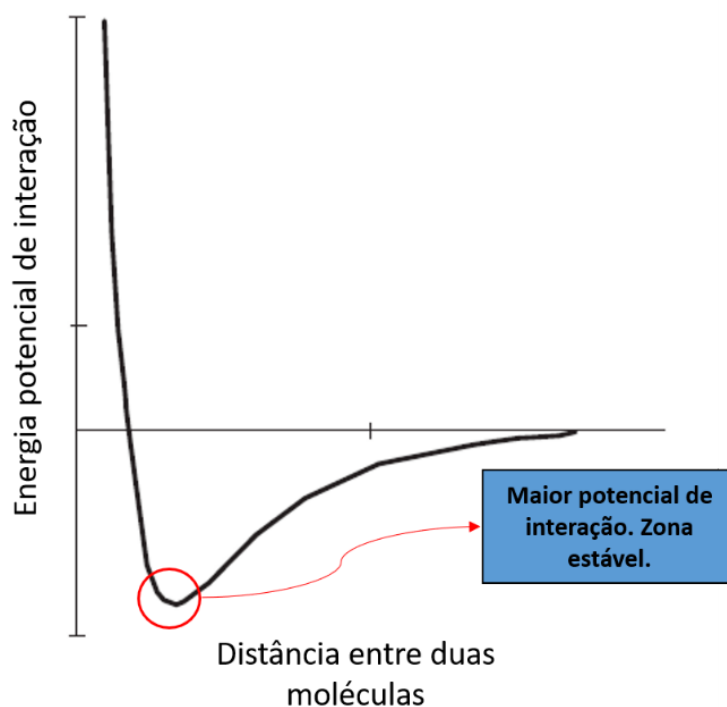
Logo, a representação do campo de força em uma modelagem molecular pode ser escrita de forma simplificada na equação 9 e em uma forma explícita na equação 10.

$$U_{\text{campo de força}} = \sum U_{\text{alongamento}} + \sum U_{\text{torção}} + \sum U_{\text{diedros}} + \sum U_{\text{inversão}} + \sum U_{\text{van der Waals}} + \sum U_{\text{Coulomb}} \quad (9)$$

$$U_{\text{campo de força}} = \sum_{\text{alongamento}} \frac{1}{2} k_{AB} (R_{AB} - R_{e,AB})^2 + \sum_{\text{torção}} \frac{1}{2} k_{AB} (\theta_{AB} - \theta_{e,AB})^2 + \sum_{\text{diedros}} (1 - \cos(n(X - X_e))) + \sum_{\text{inversão}} \frac{k}{2 \sin^2 \psi_e} (\cos \psi - \cos \psi_e)^2 + \sum_{\text{van der Waals}} \left(\frac{C_A}{R_A} \right)^{12} - \left(\frac{C_B}{R_B} \right)^6 + \sum_{\text{Coulomb}} \frac{1}{4\pi\epsilon_o} \left(\frac{Q_A Q_B}{R_{AB}} \right) \quad (10)$$

Na modelagem molecular, o cálculo de campo de força na interação entre duas moléculas tem como objetivo, fornecer o potencial global da interação, tendo como variável a distância entre os átomos. Esse mínimo tem a sua representação no poço da figura 20.

Figura 20: Representação esquemática do potencial de energia de interação entre átomos e moléculas.



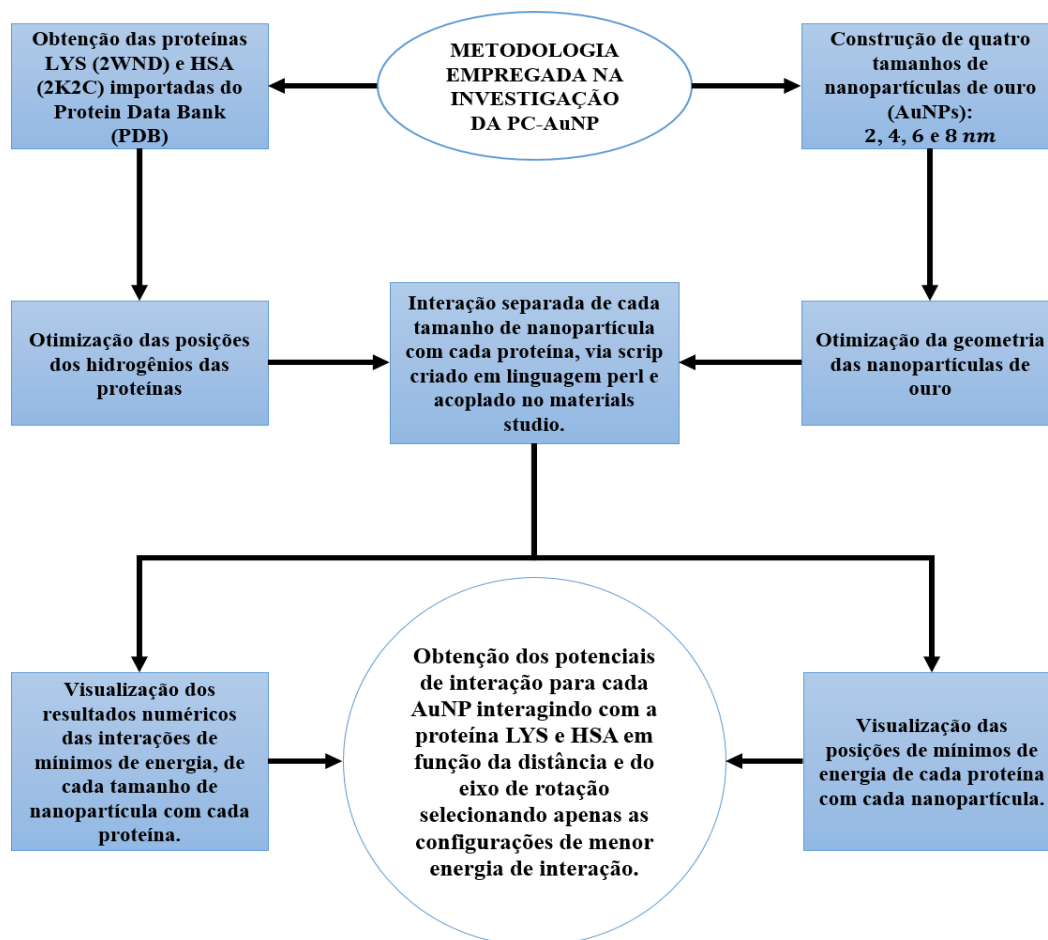
Fonte: (AUTOR).

3. METODOLOGIA

A investigação do efeito corona em nanopartículas de ouro via modelagem molecular teve como principal objetivo realizar uma varredura da energia potencial de interação entre as proteínas lisozima (LYS, 2nwd) e albumina humana (HSA, 4k2c), com nanopartículas de ouro de quatro tamanhos distintos (2, 4, 6 e 8 nm), tendo a finalidade de determinar as configurações que apresentam maiores energias de interação (mínimos).

Neste trabalho utilizamos o módulo *forcite* presente no software *Materials Studio 5.5*, para otimizar as posições das proteínas, mantendo as posições dos átomos pesados fixas, bem como realizamos as otimizações das posições atômicas das AuNPs. Para todos os cálculos utilizamos o campo de força *Universal* (RAPPÉ et al., 1992). A figura 21, mostra uma esquematização resumida da metodologia empregada para a obtenção dessas energias potenciais.

Figura 21: Fluxograma da metodologia de investigação da PC@AuNP empregada nessa pesquisa.

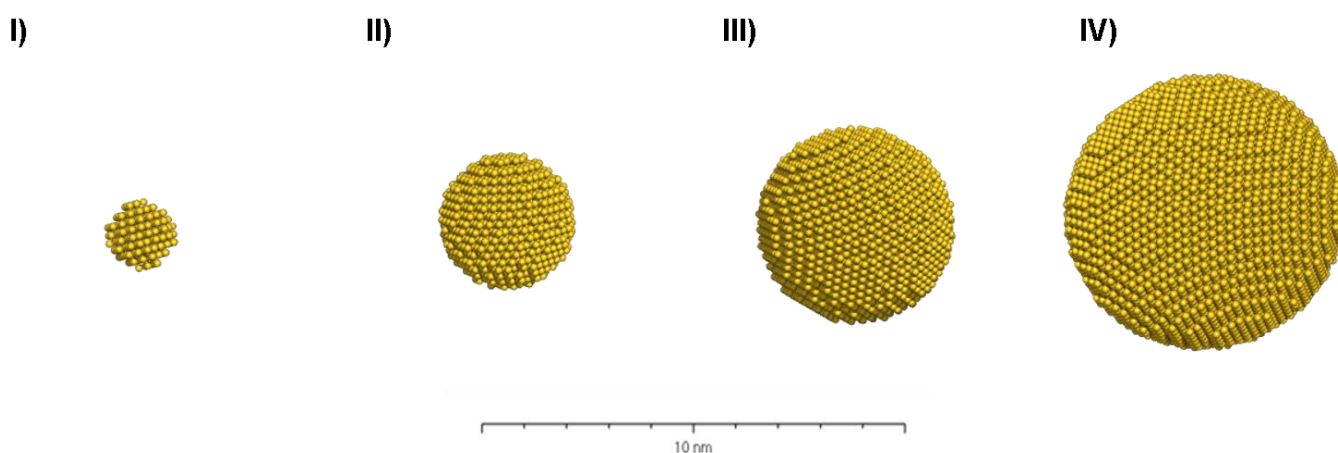


Fonte: (AUTOR).

3.1. MODELAGEM MOLECULAR DAS NANOPARTÍCULAS E PROTEÍNAS

Foram criadas e otimizadas quatro nanopartículas esféricas de ouro (AuNPs) com diâmetros de 2, 4, 6 e 8 nm, denominadas de AuNP2, AuNP4, AuNP6 e AuNP8, respectivamente. Essas foram construídas na interface gráfica do *software Materials Studio 5.5*. Suas construções adotaram os seguintes procedimentos: as células unitárias do ouro foram importadas separadamente da própria biblioteca do programa sendo estas organizadas para dar origem as nanopartículas esféricas com os diâmetros escolhidos como mostrado na figura 22. As massas atômicas e as fórmulas químicas das AuNPs são mostradas na tabela 1. Após a obtenção das AuNPs, obtivemos as propriedades moleculares mostradas na tabela 2.

Figura 22: Representação das nanopartículas de ouro denominadas AuNPs. I) AuNP2. II) AuNP4. III) AuNP6. IV) AuNP8. Nesta representação as AuNPs estão em escala crescente.



Fonte: (AUTOR).

Tabela 1: Fórmula química e massa atômica obtida com as AuNPs.

AuNPs	2 nm	4 nm	6 nm	8 nm
Fórmula química	<i>Au</i> 249	<i>Au</i> 1985	<i>Au</i> 6699	<i>Au</i> 15756
Massa atômica	49044.55 u	390978.8 u	1.32e6 u	3.10e6 u

Fonte: (AUTOR).

Tabela 2: Propriedades das AuNPs antes da otimização.

AuNPs	2 nm	4 nm	6 nm	8 nm
Energia total	-7.21 <i>kcal.mol⁻¹</i>	-105.58 <i>kcal.mol⁻¹</i>	-413.56 <i>kcal.mol⁻¹</i>	-1041.06 <i>kcal.mol⁻¹</i>
Parcelas que contribuíram para energia total (<i>kcal.mol⁻¹</i>):				
Interação	-7.21	-105.58	-413.56	-1041.06
van der Waals	-7.21	-105.58	-413.56	-1041.06
Eletrostática	0.000	0.000	0.000	0.000
rms force	$4.8e^{-1}$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>	$3.43e^{-1}$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>	$2.80e^{-1}$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>	$2.45e^{-1}$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>
max force	$1.16e^{-1}$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>	$1.16e^{-1}$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>	$1.16e^{-1}$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>	$1.16e^{-1}$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>

Fonte: (AUTOR).

As AuNPs foram otimizadas seguindo o referencial da modelagem molecular clássica, de acordo com o campo de força mostrado na equação 10, citada anteriormente no tópico de mecânica molecular da fundamentação teórica. Metodologicamente, essa equação está inserida no algoritmo do *forcite* que utiliza os parâmetros do campo de força *Universal* para otimizar as moléculas quanto aos seguintes parâmetros: ângulos, torções, alongamentos, interações de van der Waals e interações de *Coulomb*, todas de acordo com os trabalhos de Rappé et al. (1992), Casewit et al. (1992a), Casewit et al. (1992b), Rappé et al. (1993). Os parâmetros inseridos no *software* para simulação, são mostrados na tabela 3.

As proteínas lisozima humana (LYS, 2nwd) e albumina humana (HSA, 4k2c), tiveram suas estruturas 3D importadas do *Protein Data Bank* (PDB), obtidas pelos pesquisadores Wang Y. (2013) e Durek T. (2006), respectivamente. As estruturas são mostradas na figura 23.

As proteínas tiveram seus hidrogênios adicionados e otimizadas utilizando o mesmo referencial teórico e parâmetros (ver tabela 3) utilizados para otimização das AuNPs. Antes da otimização as proteínas possuíam as seguintes propriedades moleculares, mostrado na tabela 4.

Tabela 3: Parâmetros utilizados na otimização das AuNPs.

Ferramenta de otimização utilizada	<i>Forcite calculation</i>
Otimização	<i>Energy and geometry</i>
Algoritmo utilizado	<i>Smart</i>
Energia	<i>0,001 kcal.mol⁻¹</i>
Força	<i>0,5 kcal.mol⁻¹</i>
Máximo de interações para convergência	<i>500</i>
Qualidade da simulação	<i>Ultra fine</i>
Campo de força	<i>Universal</i>
Carga	<i>Use current</i>
Qualidade	<i>Ultra fine</i>
Eletrostática	<i>Atom Based</i>
van der Waals	<i>Atom Based</i>

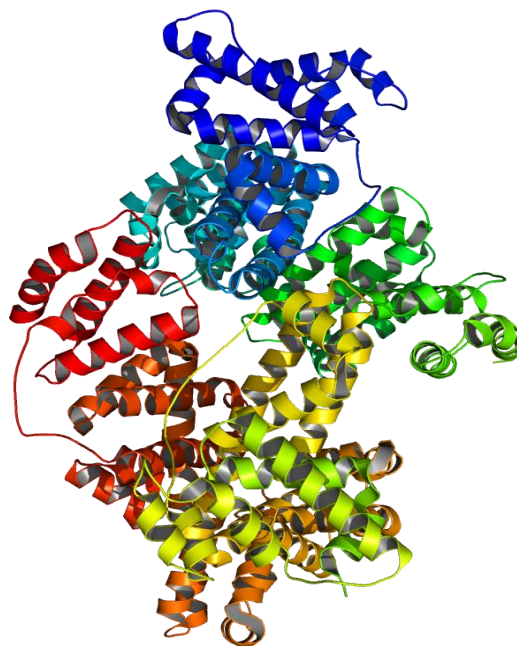
Fonte: (AUTOR).

Figura 23: Proteínas modeladas para a pesquisa. I) LYS isolada por Wang Y. (2013), PDB 2nwd. II) HSA isolada por Durek T. (2006), PDB 4k2c.

I)



II)



Fonte: (AUTOR).

Tabela 4: Propriedades das proteínas antes da otimização.

Proteínas	LYS	HSA
Energia total	12405.37 <i>kcal.mol⁻¹</i>	57390.89 <i>kcal.mol⁻¹</i>
Parcelas que contribuíram para energia total (<i>kcal.mol⁻¹</i>):		
Energia de valência	10646.69	17223.66
Ligação	9317.25	3277.84
Ângulo	925.49	10346.41
Torção	389.93	3531.37
Inversão	14.07	68.02
Interação	1758.67	40167.23
van der Waals	1758.67	40167.23
Eletrostática	0.000	0.000
rms force	$6.995e^1$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>	$2.913e^2$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>
max force	$7.565e^2$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>	$4.004e^4$ <i>kcal.mol⁻¹A⁻¹</i>

Fonte: (AUTOR).

3.2. MODELAGEM MOLECULAR DA INTERAÇÃO PROTEÍNA@AuNP

Para o cálculo de energia de interação entre as proteínas e as nanopartículas (Proteína@AuNP), foi empregada a ferramenta *forcite* do *software Materials Studio 5.5*, juntamente com o campo de força *Universal*. Nele foram realizados cálculos de energias para diferentes configurações das estruturas proteínas mais nanopartículas em busca de encontrar a a partir energias suas energias de interação levando em conta os diferentes tamanhos e diferentes configurações das proteínas. A modelagem da interação Proteína@AuNP adapta a equação 10, mostrada no tópico de mecânica molecular da fundamentação, para a seguinte equação 11.

$$E_{\text{int}}(\text{Proteína@AuNPs}) = E_{\text{T}}(\text{Proteína} + \text{AuNP}) - E_{\text{P}}(\text{Proteína}) - E_{\text{N}}(\text{AuNP}) \quad (11)$$

onde E_{int} é energia de interação entre a proteína e a nanopartículas de ouro esférica, E_T é energia total proteína mais nanopartícula, E_P é a energia da proteína e E_N é a energia da nanopartícula de ouro.

Foram realizados cálculos da energia interação para os seguintes sistemas: LYS@AuNP2, LYS@AuNP4, LYS@AuNP6, LYS@AuNP8, HSA@AuNP2, HSA@AuNP4, HSA@AuNP6, HSA@AuNP8, totalizando oito sistemas a ser investigados. Onde LYS representa a lisozima, HSA representa a albumina, AuNP representa a nanopartículas de ouro e o número ao final da nomenclatura representa o tamanho da nanopartículas em nanômetros.

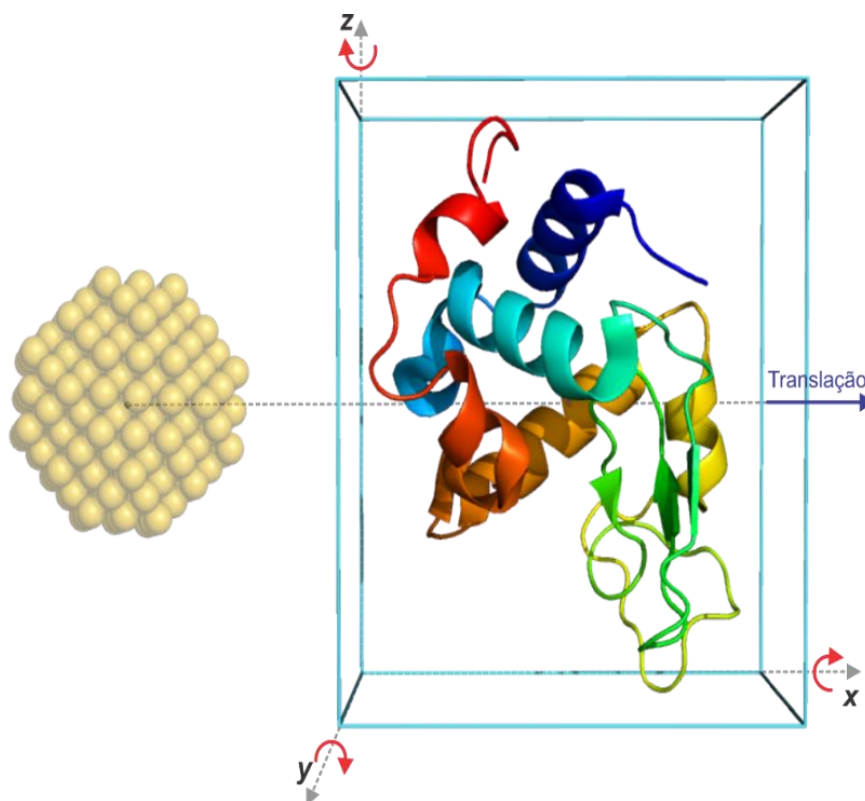
Cada uma das oito simulações partiu do seguinte *input*: separadamente cada proteína e cada nanopartícula foram plotadas nos eixos (0,0,0), com seus centroides fixados.

As simulações seguiram o roteiro codificado em *script* que realiza rotações, translações, cálculos de energia das estruturas no referencial teórico descrito na seção de metodologia, e organiza os resultados em tabelas. O *scan* realizado consiste em fixar uma estrutura no eixo (0,0,0) e variar a posição da outra estrutura calculando o potencial da energia de interação formada. Logo, na interação Proteína@AuNP, fixamos a nanopartículas de ouro eixo (0,0,0) enquanto cada proteína teria sua posição sendo variada. A metodologia de variação das proteínas tiveram como premissa varrer a maior quantidade de posições possíveis, respeitando a relação custo computacional versus a precisão dos resultados. Diante disso, cada um dos oito sistemas foram divididos em três subsistemas independentes, seguindo o roteiro de manter a AuNP fixa no eixo (0,0,0) e transladar a proteína do centro da AuNP por 16 nm, fazendo *steps*, e calculando energia a cada *step*, de 0,05 nm, enquanto que, separadamente, a proteína rotacionava nos seus três eixos, X, Y e Z, até completar a rotação total de 360° em cada eixo com *steps* de 5°, e calculando novamente a energia a cada *step*. Logo, cada modelagem Proteína@AuNP, gerava um conjunto de três resultados de interação, sendo eles translação mais rotação no eixo X, translação mais rotação no eixo Y e translação mais rotação no eixo Z. A exemplificação de cada conjunto de simulação é mostrada na figura 24, onde é utilizado a simulação LYS@AuNP2 como exemplo.

Ao todo foram realizadas 24 modelagens, que obtiveram um total de 29.859.840,0 cálculos de energias das configurações obtidas entre as nanopartículas esféricas de ouro e as proteínas estudadas.

Por motivos de melhor visualização dos sítios de ligação da proteína, os resultados serão mostrados com posições diferentes das nanopartículas, adotando as cores de verde para translação e rotação da proteína no eixo X, vermelho para o eixo Y e azul para o eixo Z.

Figura 24: Representação da modelagem das interações Protéina@AuNP, utilizando como exemplo a simulação LYS@AuNP2.



Fonte: (AUTOR).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. MODELAGEM MOLECULAR DAS NANOPARTÍCULAS E PROTEÍNAS

A modelagem molecular das AuNPs e proteínas tiveram como finalidade encontrar as estruturas mais estáveis para uma posterior interação Proteínas@AuNPs.

4.1.1. Otimização das nanopartículas

A tabela 5, mostra as energias das AuNPs pós otimização bem como os critérios de convergências. Comparando essas propriedades com as mostradas na tabela 2, do capítulo de metodologia, conseguimos notar uma diferença nos valores destes parâmetros mostrando que

houve um ajuste dos átomos presentes nas moléculas de cada AuNP, em busca do mínimo de energia potencial.

A AuNP2 saiu de uma energia total de $-7.21 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para uma energia total de $-59.75 \text{ kcal.mol}^{-1}$, a AuNP4 saiu de $-105.58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-567.02 \text{ kcal.mol}^{-1}$, a AuNP6 saiu de $-413.56 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-2014.82 \text{ kcal.mol}^{-1}$, e a AuNP8 saiu de $-1041.06 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-3340.75 \text{ kcal.mol}^{-1}$, todas influenciadas pelas interações de coulombianas e interações de *van der Waals*. Podemos notar, que além de todas terem sua energia total reduzida, ainda existe uma relação inversamente proporcional ao tamanho da NP conrelação a diminuição da energia de interação, vemos que a AuNP2 teve uma diminuição de cerca de 828,71%, a AuNP4 uma diminuição de cerca de 537,05%, a AuNP6 de 487,18% e a AuNP8 de 320,89%.

Foi mostrado a importância da modelagem das NPs, e a eficiência do campo de força em representar o sistema, já que essas tiverem diferentes resultados de energia de interação pós otimização, para isso utilizamos 500 interações até a convergência, mostrado na tabela 3 do capítulo de metodologia.

Tabela 5: Propriedades das AuNPs pós otimização.

AuNPs	2 nm	4 nm	6 nm	8 nm
Energia total	-59.75 kcal.mol^{-1}	-567.02 kcal.mol^{-1}	-2014.82 kcal.mol^{-1}	-3340.75 kcal.mol^{-1}
Parcelas que contribuíram para energia total (kcal.mol^{-1}):				
Interação	-59.75	-567.02	-2014.82	-3340.75
van der Waals	-59.75	-567.02	-2014.82	-3340.75
Eletrostática	0.000	0.000	0.000	0.000
rms force	$4.13e^{-2}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$	$2.40e^{-3}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$	$1.15e^{-3}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$	$8.30e^{-2}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$
max force	$1.49e^{-1}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$	$1.16e^{-2}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$	$6.63e^{-3}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$	$3.15e^{-1}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$

Fonte: (AUTOR).

4.1.2. Otimização das proteínas

Comparando a tabela 6, pós otimização, com a tabela 4, dada pelo *software* antes da otimização, vemos que as energias totais de interação tanto da LYS (2nwd) quanto da HSA (4k2c) baixaram, sendo as parcelas que contribuíram para essa energia a parcela de valência, ligação, ângulo, torção, inversão, interação de não ligante e *van der Waals*. A LYS teve sua energia total reduzida de $12405.37 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $962.51 \text{ kcal.mol}^{-1}$ tendo uma redução de 1288,85%, a HSA teve saiu de $57390.89 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $8264.99 \text{ kcal.mol}^{-1}$, representando uma redução de 694,38%. Notamos que assim como as AuNPs, maiores moléculas tiveram uma menor diferença de redução de energia total.

Novamente foi mostrado a importância da otimização das moléculas, o *software* foi eficiente e a otimização aconteceu em um critério de 500 interações para convergência.

Tabela 6: Propriedades das proteínas pós otimização.

Proteínas	LYS	HSA
Energia total	962.51 kcal.mol^{-1}	8264.99 kcal.mol^{-1}
Parcelas que contribuíram para energia total (kcal.mol^{-1}):		
Energia de valência	948.01	8236.25
Ligação	183.45	1691.72
Ângulo	519.14	3879.34
Torção	240.53	2624.01
Inversão	4.88	41.18
Interação	14.49	28.73
van der Waals	14.49	28.73
Eletrostática	0.000	0.000
rms force	$1.36e^{-1}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$	$3.57e^{-1}$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$
max force	2.58 $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$	$2.62e^1$ $\text{kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$

Fonte: (AUTOR).

4.2. MODELAGEM MOLECULAR DA INTERAÇÃO PROTEÍNA@AuNP

A modelagem molecular da interação Proteína@AuNPs, buscou encontrar os maiores potenciais de energia de interação, as regiões preferencias de interação, bem como as nanopartículas que possuem a maior quantidade de superfície livre com a proteína em questão, fatores que favorecem a formação do efeito PC.

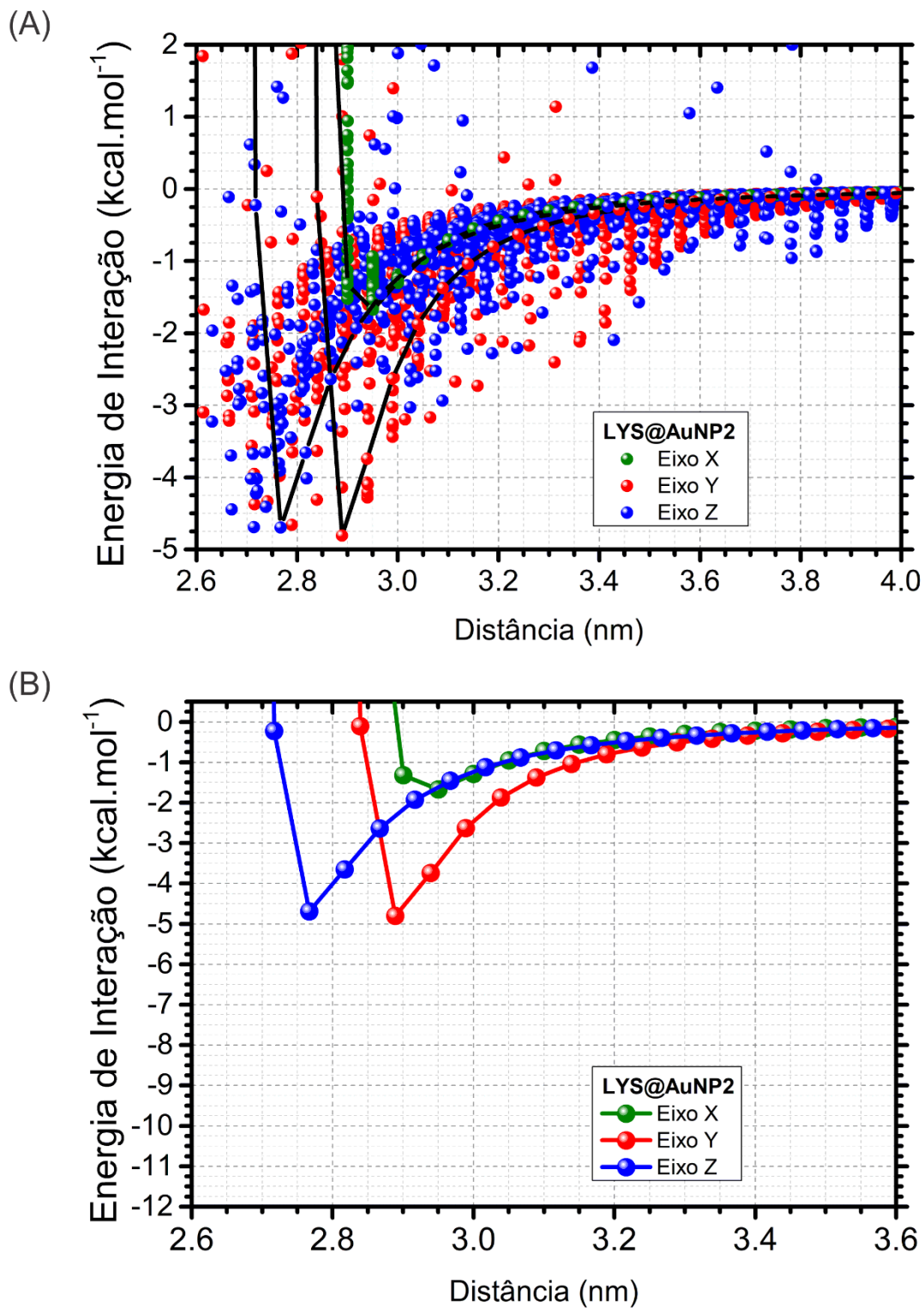
4.2.1. Modelagem molecular da interação lisozima com as nanopartículas de ouro

A figura 25 (A) mostra os potenciais de energia de interação entre a LYS@AuNP2, nessa encontra-se os maiores potenciais em cada eixo de simulação, no qual são destacados e representados na figura 25 (B). Podemos observar que embora aja diferentes potenciais, esses tendem a convergir em 2,6 a 3,2 nm, entre centroide, além de não ter mais uma influência de mudança de potencial quando a distância ultrapassa 4 nm, sendo convergido a zero.

A figura 25 (B) mostra apenas os pontos que obtiveram os maiores potenciais. Temos três perfis distintos de potenciais de energia de interação, sendo a rotação da proteína no eixo X com uma energia de aproximadamente $-1,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, no eixo Y aproximadamente $-4,95 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e no eixo Z aproximadamente $-4,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$. A figura 24 do capítulo de metodologia, mostra que existe uma tendência natural de maior varredura nos eixos Y e Z, que podem probabilisticamente encontrarem os maiores potenciais de interação, a qual nessa modelagem mostrou-se como sendo o eixo Y. Todas as interações foram formadas com potenciais de energia quando a proteína transladava em distâncias entre centroides da AuNP2 em aproximadamente 2,7 a 3 nm.

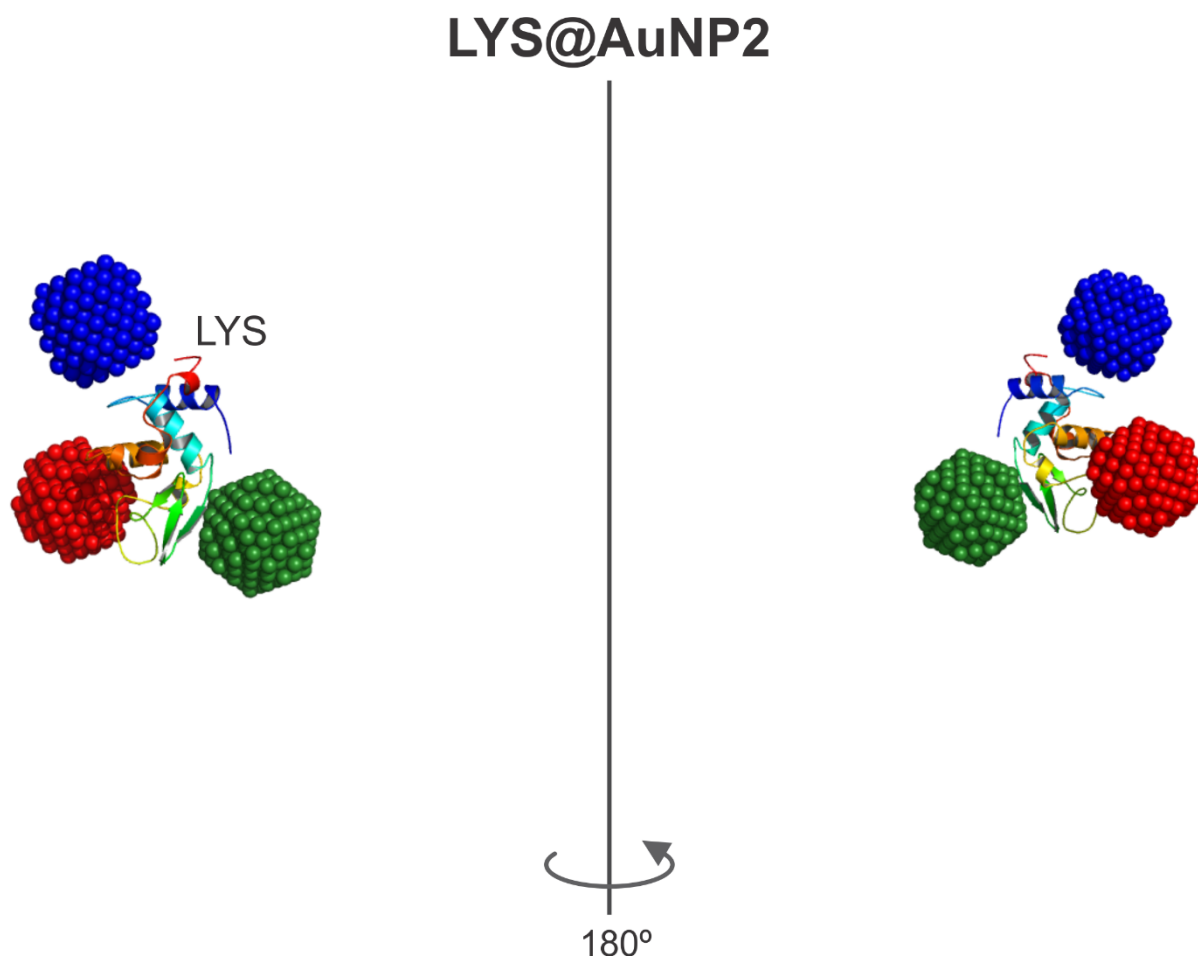
A figura 26 mostra em duas vistas rotacionadas em 180° as diferentes posições de interação. Essa diferença de estabilização da AuNP2 em diferentes regiões de ligação da LYS, permite concluir que a proteína possui diferentes locais capazes de formação do efeito corona, sendo uma das características necessárias para transição da corona mole para a corona dura (HARRIS et al., 2018; KHARAZIAN et al., 2016). Por outro lado, como nessa situação temos um tamanho de AuNP muito próximo do tamanho da proteína, é possível que não aja a formação da PC, tendo um complexo de proteínas com coroas incompletas, já que não haveria uma área superficial suficiente para formação de uma camada de LYS em uma AuNP2 (PIELLA et al., 2017). A AuNP2 possui uma área superficial de $12,56 \text{ nm}^2$.

Figura 25: (A) Potenciais de energia de interação entre LYS@AuNP2. (B) Maiores potenciais de interação da LYS@AuNP2.



Fonte: (AUTOR).

Figura 26: Posições de maior afinidade potencial na interação LYS@AuNP2.



Fonte: (AUTOR).

Os potenciais de energia formados entre a LYS@AuNP4 são mostrados na figura 27 (A), são marcados os três perfis que formam os maiores potenciais. Podemos observar uma convergência de posições estáveis entre potenciais entre 3,8 e 4,0 nm, e uma convergência após 4,8 nm, que não há mais uma forte interação, tendendo a zero.

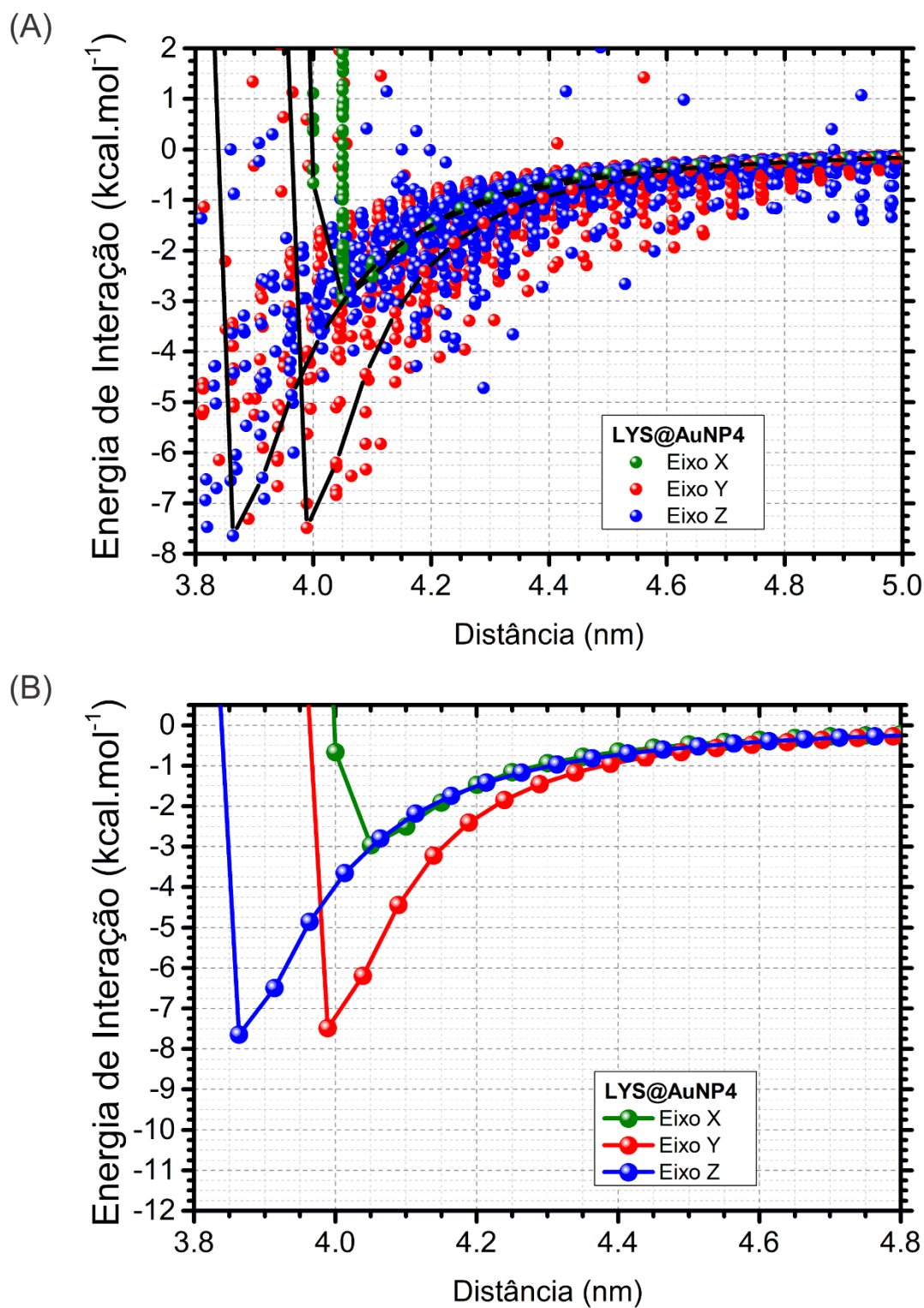
A figura 27 (B), mostra os maiores potenciais de energia encontrados na LYS@AuNP4. Conseguimos perceber uma grande semelhança no poço potencial do eixo Y e do eixo Z, estando esses próximos em suas energias de interação, cerca de $-7,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o eixo Y e $-7,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o eixo Z, e em suas distâncias entre centroides da nanopartícula e da proteína, com 3,9 nm e 3,85 nm, respectivamente. A AuNP4 que teve a proteína rotacionando no eixo X, apresentou diferenças quando comparado aos eixos Z e Y, tendo uma energia de interação de cerca de $-2,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e no deslocamento do eixo entre os centroides com o potencial de estabilizando em uma distância de 4,3 nm.

Podemos explicar novamente, de acordo com a metodologia empregada, que os potenciais de energia de interação nos eixos Y e Z tendem a possuírem maiores varreduras potenciais quando comparados ao eixo X. Podemos pressupor graficamente, que as regiões potenciais Y e Z estão próximos e apresentam interações semelhantes, essa proximidade é confirmada na figura 28, onde é mostrada as posições de menores potenciais. Entretanto, não é possível nessa discussão afirmar quais interações e quais sítios de aminoácidos são envolvidos.

Perceber-se uma boa semelhança entre a modelagem molecular da LYS@AuNP2 com a LYS@AuNP4, comparando as vistas da figura 26 com as da figura 28, vemos que locais que são formados os maiores potenciais de interação quase que se repetem, tendo por sua vez uma diferença da energia potencial, mas uma pequena diferença de posição.

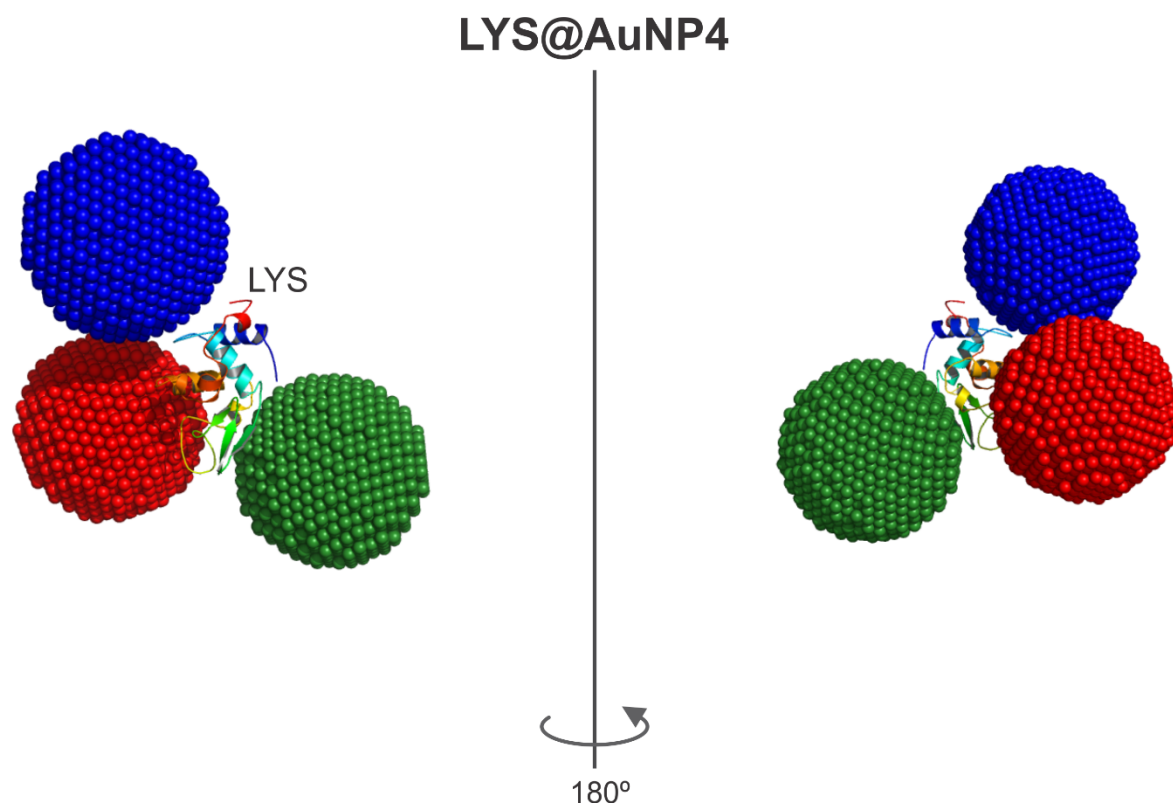
Podemos pressupor que a diferença entre os diâmetros de 2 nm para 4 nm, não é suficiente para mudança da região de ligação, mas que o tamanho da AuNP influenciou na energia de interação formada, tendo um aumento de cerca de $-2,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para os eixos de interação Y e Z, fator relevante para formação do efeito corona, que pode ser explicado pela maior área superficial da AuNP4 (LIU e PENG, 2017; CARRILLO-CARRION et al., 2017). Uma maior área superficial possibilita a ligação de outras proteínas, situação que caracteriza o começo da formação da PC (PIELLA et al., 2017). A AuNP4 possui uma área superficial de $50,26 \text{ nm}^2$, se mostrando bem maior que a área superficial da AuNP2.

Figura 27: (A) Potenciais de energia de interação entre LYS@AuNP4. (B) Maiores potencias de interação da LYS@AuNP4.



Fonte: (AUTOR).

Figura 28: Posições de maior afinidade potencial na interação LYS@AuNP4.



Fonte: (AUTOR).

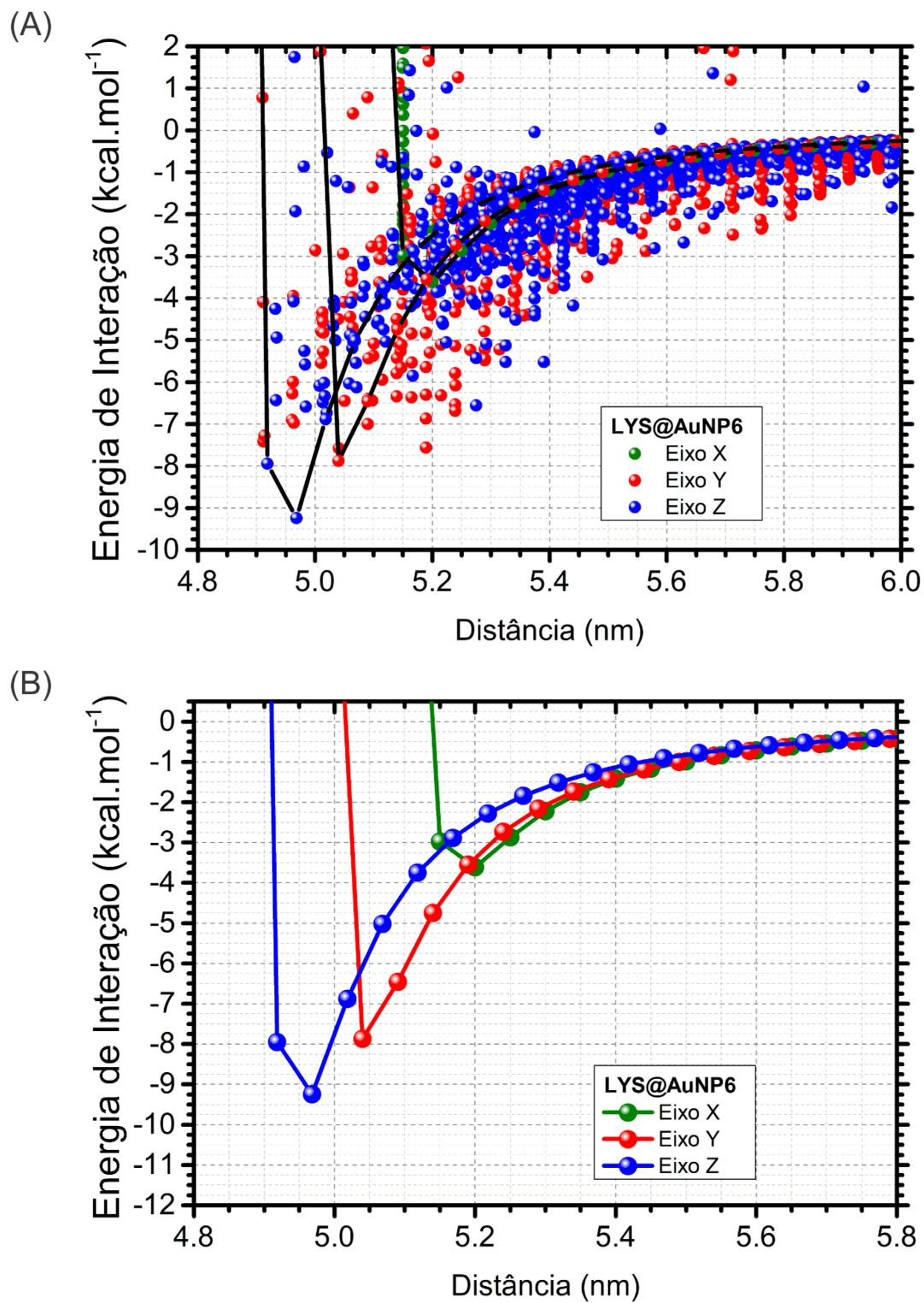
A LYS@AuNP6 tem os potenciais de energia sendo apresentado na figura 29 (A). É destacado os três perfis que apresentam os maiores potenciais, podemos observar os potenciais em cada eixo sendo convergidos entre 4,95 a 5,19 *nm*, bem como uma convergência após 6 *nm* que não gera mais posições estáveis. Observamos que existe um aumento nas distâncias dos centroides da AuNP com a LYS, quando comparado com a LYS@AuNP2 e LYS@AuNP4, fato que acontece devido aumento do tamanho da nanopartícula.

Os maiores potenciais da LYS@AuNP6 são apresentados na figura 29 (B), esses possuem grandes diferenças sobre as modelagens da LYS@AuNP2 e da LYS@AuNP4. Temos a maior energia de interação sendo apresentada na rotação da proteína no eixo Z, com uma energia de cerca de $-9,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$, seguida pelo eixo Y com -8 kcal.mol^{-1} , e tendo a menor energia no eixo X com $-3,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Interessante notar que as distâncias que foram estabilizadas os centroides da AuNP com a LYS, em cada eixo, comportou-se inversamente ao potencial de interação. O eixo Z estabilizou-se a uma distância de 4,97 *nm*, o eixo Y a uma distância de 5,08 *nm* e o X a 5,2 *nm*.

A figura 30 mostra as posições de maior afinidade potencial na interação da LYS@AuNP6, podemos perceber que houve uma formação de uma região de ligação na rotação da proteína no eixo Y, e que as proteínas que tiveram rotação nos eixos X e Z estabilizaram em regiões muito próximas, podemos pressupor que fizeram interações nas mesmas regiões de ligação da proteína.

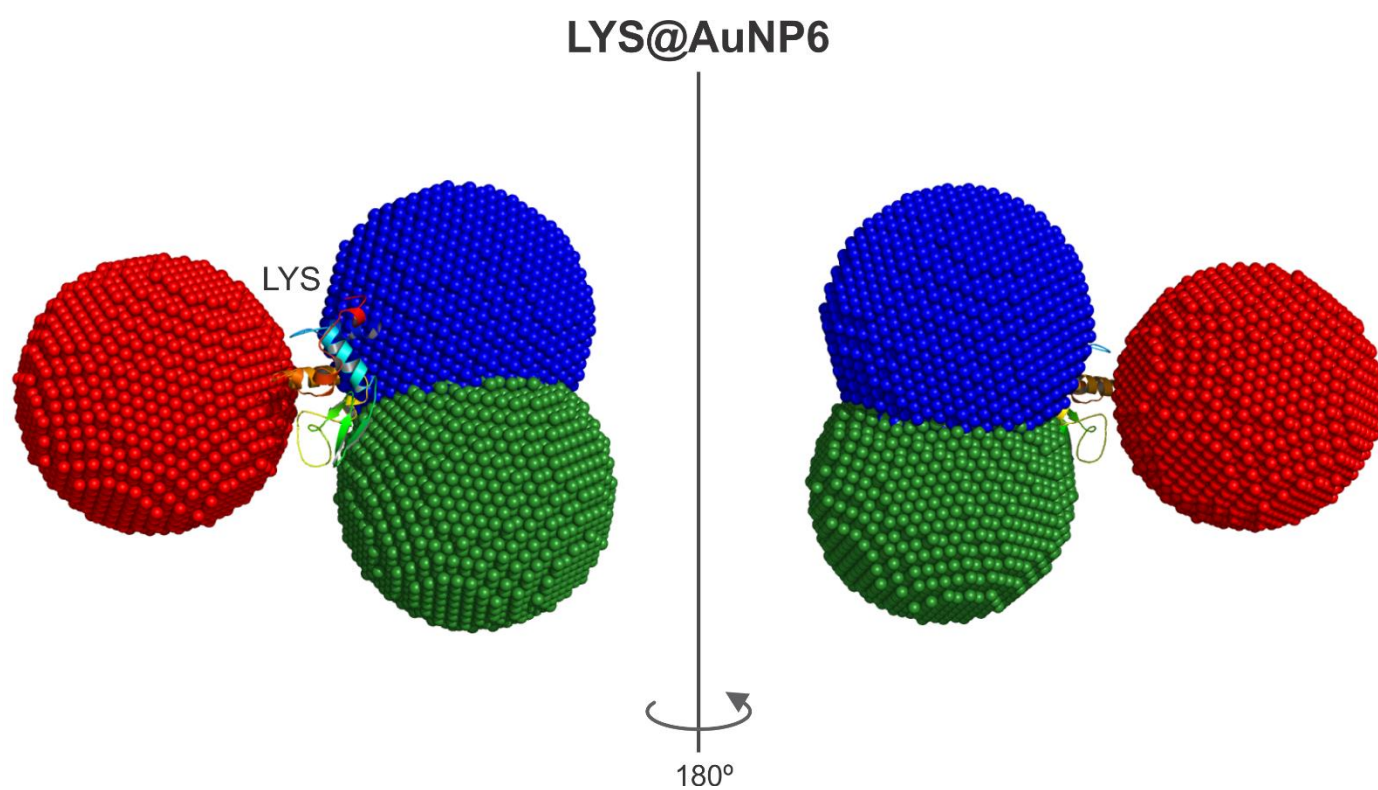
A modelagem da LYS@AuNP6 teve um grande aumento do potencial de energia de interação dos eixos X, Y e Z, sendo comparado com a modelagem da LYS@AuNP4 saiu de $-2,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-3,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, no eixo X, saiu de $-7,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para -8 kcal.mol^{-1} , no eixo Y, e $-7,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-9,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$, no eixo Z. Mostrando uma relevância do fator tamanho para formação do efeito corona, bem como para a formação de uma corona dura (PIELLA et al., 2017; LIU e PENG, 2017; CARRILLO-CARRION et al., 2017). Além disso, a figura 30 também mostra que a AuNP6 possui um espaço para interação de várias proteínas de LYS, sendo um fator que influencia na formação de uma coroa de proteínas de multicamadas, e com formação densa, que pode leva um lento equilíbrio para formação, devido a competição natural que as proteínas teriam para alcançar a superfície da nanopartícula (PIELLA et al., 2017). A AuNP6 apresenta um tamanho de superfície de $113,09 \text{ nm}^2$, que frente a proteína lisozima apresenta área livre para outras interações.

Figura 29: (A) Potenciais de energia de interação entre LYS@AuNP6. (B) Maiores potenciais de interação da LYS@AuNP6.



Fonte: (AUTOR).

Figura 30: Posições de maior afinidade potencial na interação LYS@AuNP6.



Fonte: (AUTOR).

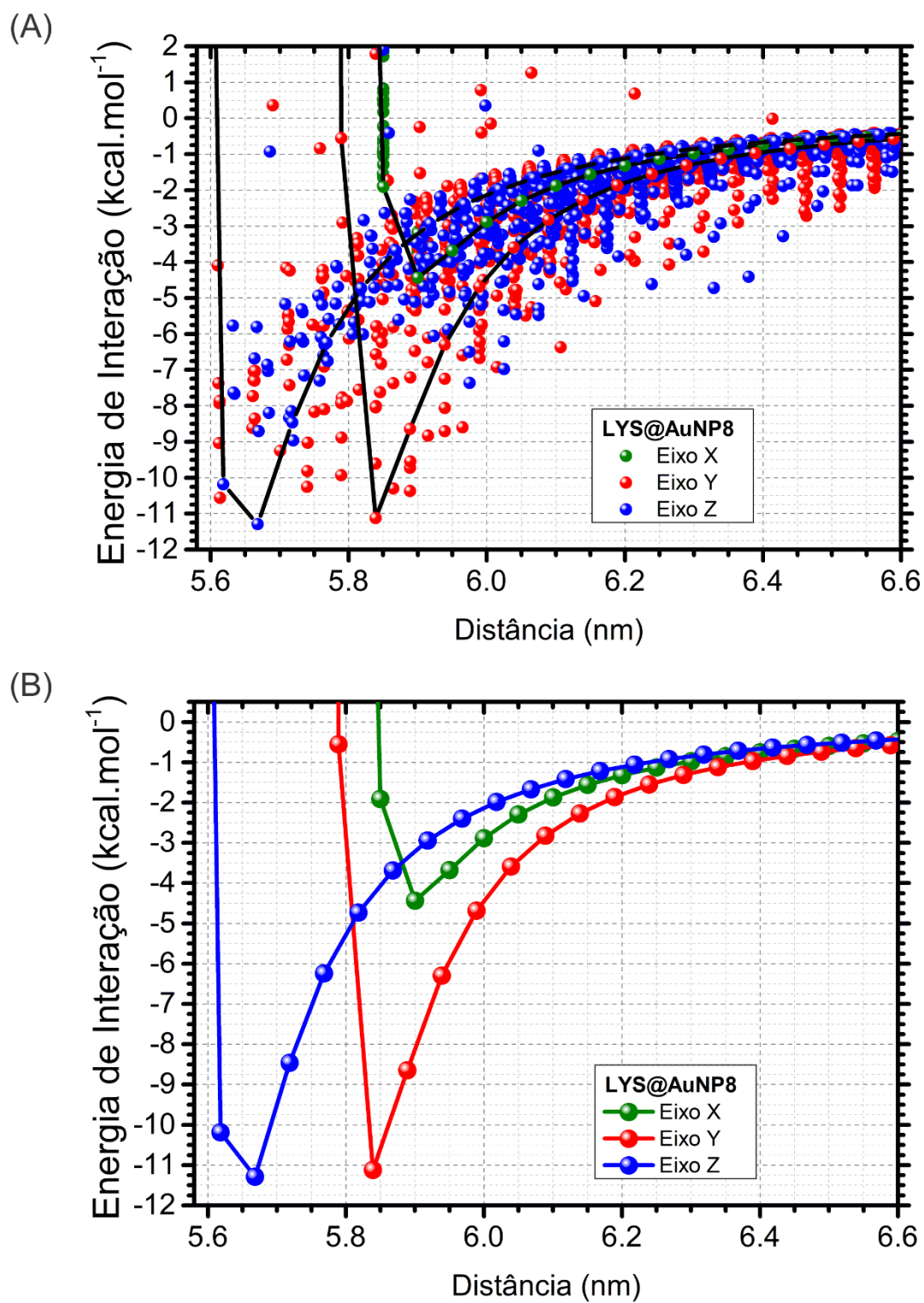
A LYS@AuNP8 tem seus potenciais de energia apresentado na figura 31 (A), com os perfis dos três maiores potenciais de energia destacados. Esses possuíram convergência de menores potenciais entre 5,65 e 5,84 nm, e convergência após 6,45 nm, que não gera mais zonas de estabilização potencial, tendo uma tendência de convergência a zero, onde há a separação da interação entre as moléculas. Existe novamente um aumento nas distâncias entre centroides, que nessa situação mostra-se como sendo a maior distância, fato esperado por estarmos trabalhando com a maior nanopartículas envolvida.

A figura 31 (B), mostra os maiores potenciais da LYS@AuNP8, percebemos novamente o maior potencial presente na rotação da proteína no eixo Z, com cerca de $-11,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, sendo esse o maior potencial presente nas modelagens LYS@AuNPs dessa pesquisa. A rotação no eixo Y possui um potencial de $-11,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$, e o potencial no eixo X de $-4,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Novamente a uma inversão entre o valor do potencial e a distâncias entre os centroides, o eixo Z estabilizou-se em cerca de 5,65 nm, o eixo Y em 5,82 nm e o eixo X em 5,84 nm.

A figura 32 mostra as posições de maior afinidade potencial na interação da LYS@AuNP8. As posições mostram-se bastante próximas com as posições mostradas na figura 30, da modelagem da LYS@AuNP6, tendo novamente a probabilidade das AuNPs estarem envolvidas nas mesmas ligações quando estabilizadas nos eixos Y e Z. A modelagem da LYS@AuNP8 teve um grande aumento da energia de interação nos eixos X, Y e Z, sendo comparado com os valores da LYS@AuNP6 que saiu de $-2,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-4,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, no eixo X, saiu de $-7,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-11,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$, no eixo Y, e $-7,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-11,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, no eixo Z. Mostrando mais uma vez a relevância do fator tamanho das nanopartículas para formação do efeito corona, bem como para a formação de um possível corona duro (PIELLA et al., 2017; LIU e PENG, 2017; CARRILLO-CARRION et al., 2017).

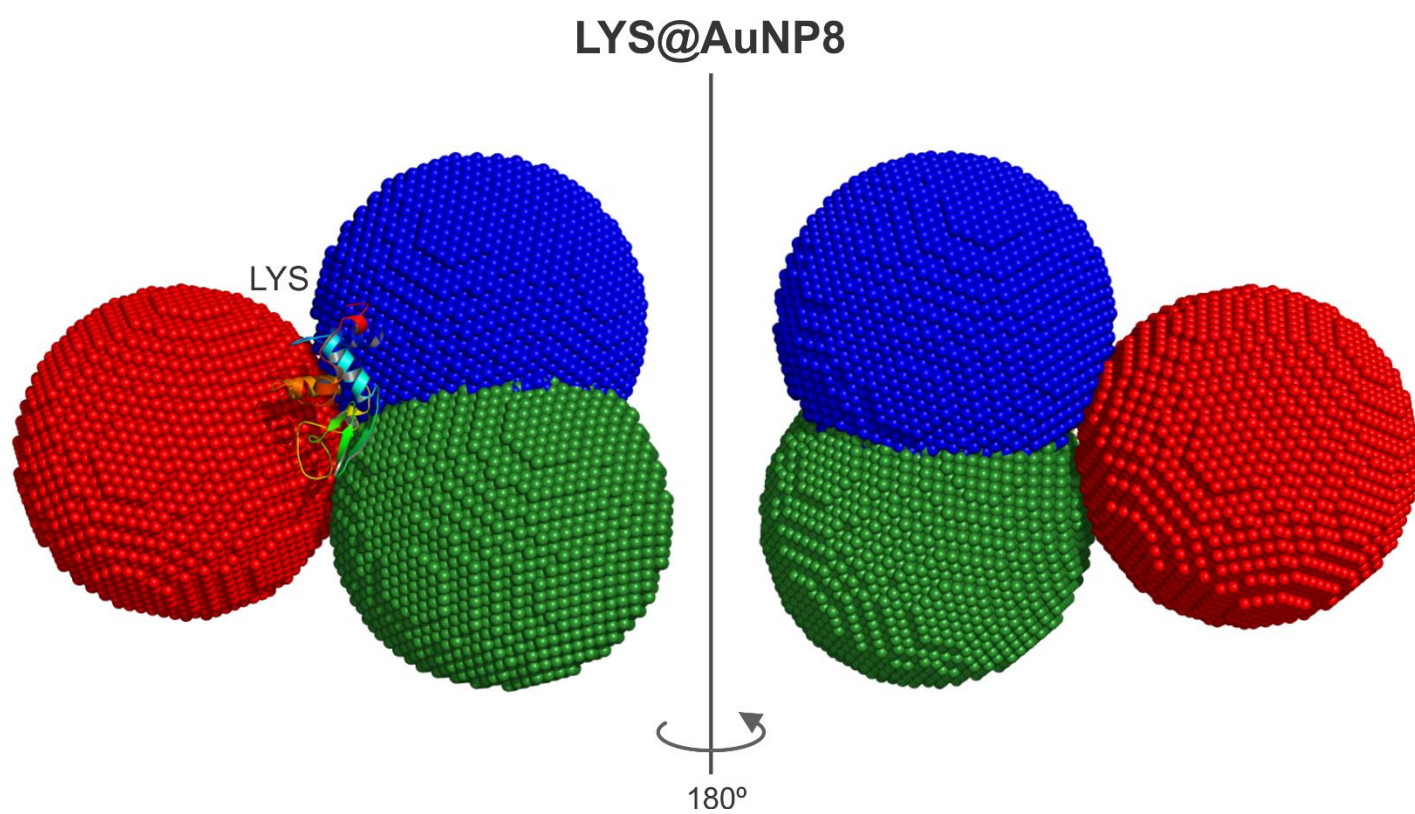
A LYS@AuNP8, dentre todas as outras modelagens realizadas nessa pesquisa envolvendo a LYS, obteve todos os parâmetros necessários para formação da PC. Tendo um alto valor de energia de interação e, sugerindo assim condições para uma possível formação de uma coroa de multicamadas, densa, com lento equilíbrio, se caracterizando como corona dura (PIELLA et al., 2017). Considerando que o diâmetro está influenciando nos valores da energia de interação entre as nanopartículas e proteínas calculamos a área superficial da AuNP8 que é de $201,06 \text{ nm}^2$.

Figura 31: (A) Potenciais de energia de interação entre LYS@AuNP8. (B) Maiores potenciais de interação da LYS@AuNP8.



Fonte: (AUTOR).

Figura 32: Posições de maior afinidade potencial na interação LYS@AuNP8.

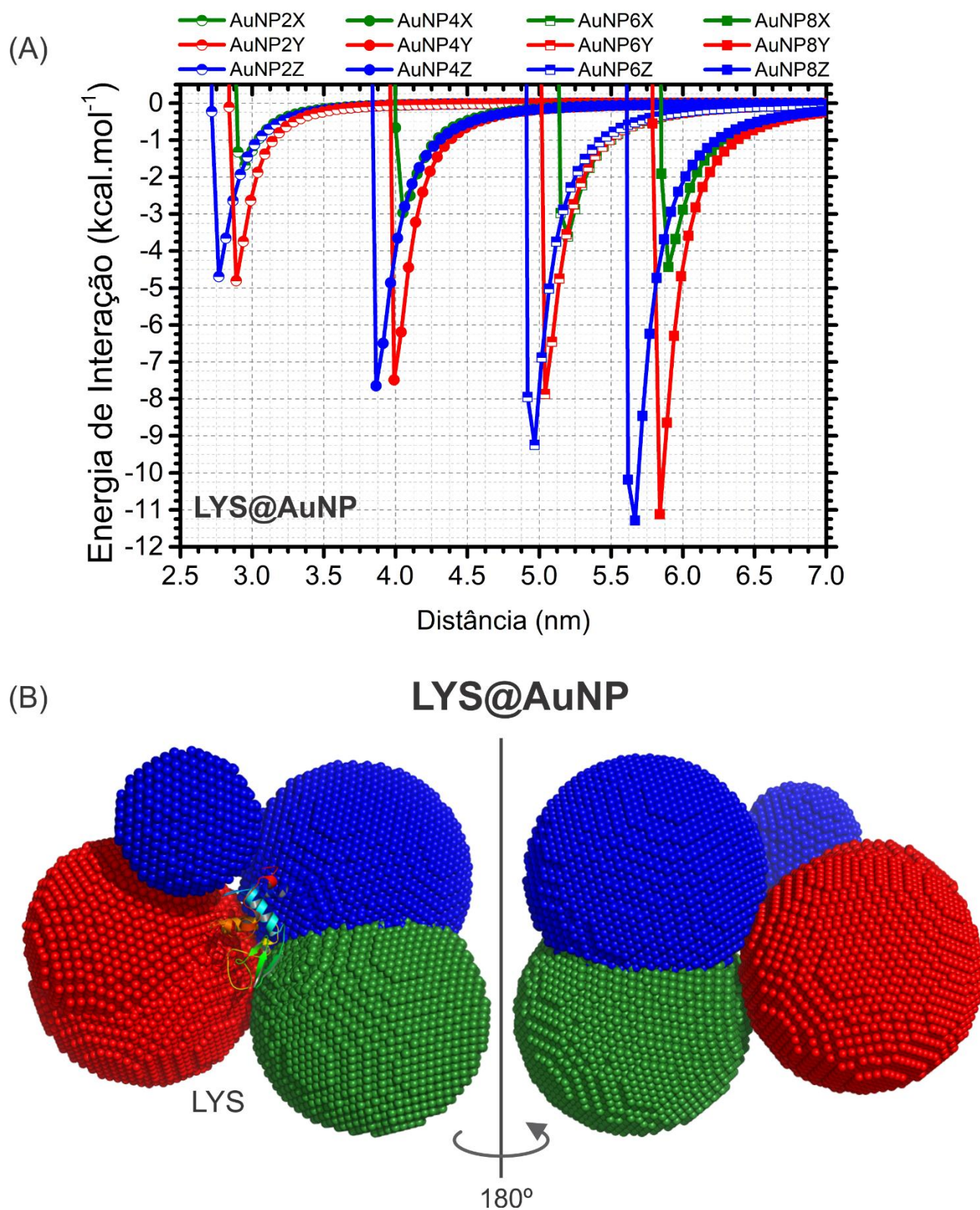


Fonte: (AUTOR).

A figura 33 (A), mostra graficamente os potenciais de todas as interações envolvidas entre a LYS@AuNPs. Podemos notar claramente o crescimento no potencial de interação a medida que ocorre o aumento do tamanho da nanopartícula. Observamos que exceto a AuNP2, todos os outros conjuntos de modelagens tiveram o eixo Z como o maior potencial de interação, mostrando-se como a rotação que permite a melhor varredura potencial, entre a LYS@AuNPs. Além disso é possível notar um deslocamento crescente na distância entre os centroides, fato que é elucidado pelo aumento do diâmetro da AuNP.

Na figura 33 (B) mostra-se todas as interações dos maiores potenciais (mínimos) em cada eixo. Conseguimos perceber que existem sobreposições de nanopartículas que se estabilizam na mesma região da proteína, embora tendo diâmetros diferentes. Dessa forma, conseguimos pressupor que existem quatro regiões possíveis de ligação entre os tamanhos envolvidos de AuNPs nessa pesquisa e a LYS.

Figura 33: (A) Maiores potências de interação dentre todos os eixos modelados das LYS@AuNPs. (B) Posições de maior afinidade potencial dentre todos os eixos na interação LYS@AuNPs.



Fonte: (AUTOR).

A figura 34 (A) conclui graficamente as modelagens LYS@AuNPs, mostrando apenas os maiores energias de interação encontradas. O gráfico mostra que dentre as nanopartículas estudadas com a LYS, a que possui o maior potencial de formação do efeito corona, bem como PC é a AuNP8, possuindo uma forte interação potencial bem como superfície livre para formação de multicamadas de proteínas, que se tornam densas e formam a corona dura após uma transição dinâmica *Vroman* (PIELLA et al., 2017; LIU e PENG, 2017; CARRILLO-CARRION et al., 2017).

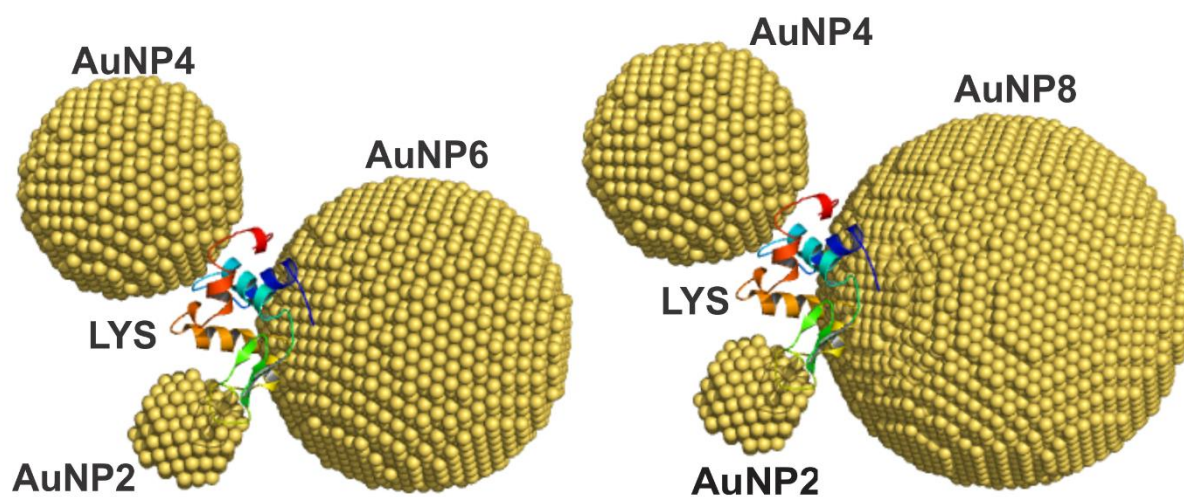
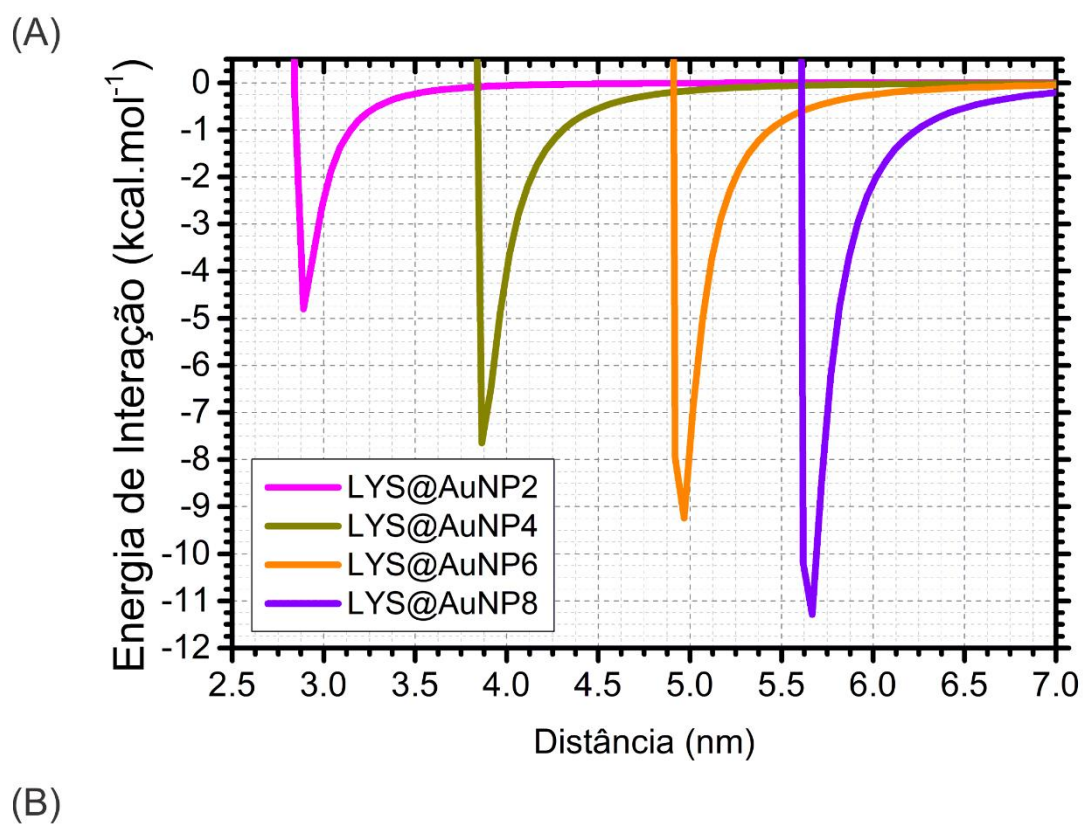
Ao contrário da figura 33 (B), que mostra todas as possíveis regiões de interação, a figura 34 (B) mostra apenas as três regiões preferenciais de interação de cada nanopartícula, onde acontece as maiores energias potenciais, sendo apresentado em três regiões distintas, onde a AuNP6 é sobreposta na mesma região da AuNP8, na qual podemos pressupor probabilisticamente que elas estão envolvidas nas mesmas ligações, embora aja uma necessidade de maior investigação.

Na modelagem da LYS@AuNPs, até o diâmetro estudado de 8 nm, não houve uma convergência de crescimento potencial, tendo todos os tamanhos de nanopartículas com crescimento potencial aparente, mostrando que há aumento de interações envolvidas em cada diâmetro apresentado.

Alguns artigos relatam a preferência de interação de proteínas com AuNPs esféricas em sítios de interação que possuem a presença do aminoácido cisteína (AJDARI e colab., 2017; BRAUN e colab., 2016; LIU e PENG, 2017; RAMEZANI e colab., 2014). Como foi mostrada na fundamentação, a lisozima é uma proteína que apresenta oito resíduos de cisteína, e todos esses estão presentes no sítio ativo da enzima. Fazendo que uma possível interação das nanopartículas nesses sítios enzimáticos, a proteína perderia sua função, sendo apenas um agente encapsulam-te, fator que fortalece a interação envolvida proporcionando a formação da corona, com a formação de multicamadas de proteínas (BRAUN e colab., 2016; CHARBGOO e colab., 2018; DING e MA, 2014; KHARAZIAN e colab., 2016; PIELLA e colab., 2017).

Entretanto, nessa investigação não a possibilidade de afirmação que todos os tamanhos de nanopartículas com a lisozima estão envolvidas em interações com a cisteína, havendo uma necessidade de maior pesquisa para essa afirmação.

Figura 34: (A) Maiores potencias das LYS@AuNPs. (B) Posições de maior afinidade na interação LYS@AuNPs.



Fonte: (AUTOR).

4.2.2. Modelagem molecular da interação albumina com as nanopartículas de ouro

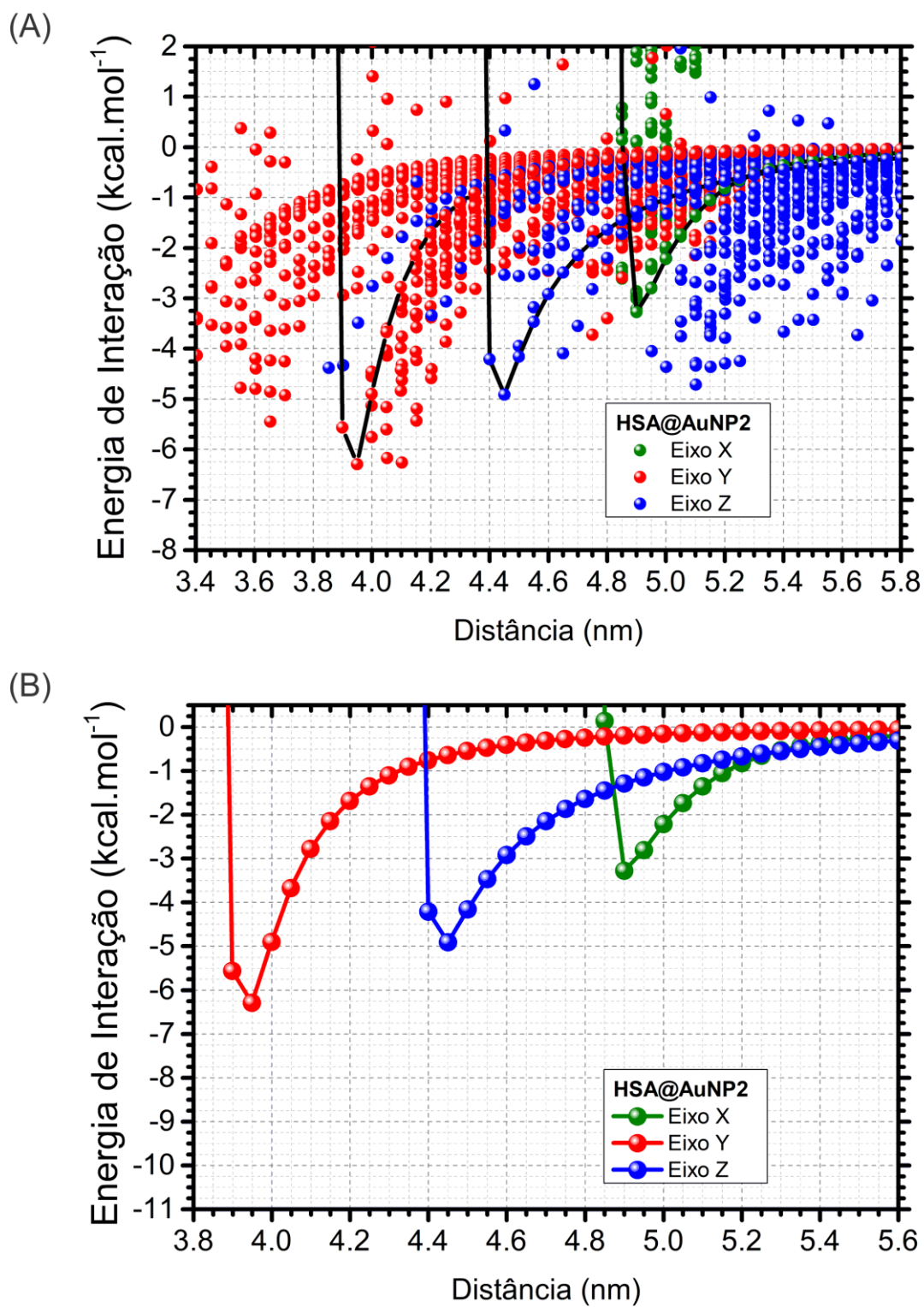
A figura 35 (A), mostra os potenciais de interações realizadas na modelagem da HSA@AuNP2, os maiores potenciais são destacados e mostrados separadamente na figura 35 (B). Em todos os potenciais de energia de interação da HSA@AuNP2 podemos perceber que as estabilizações das proteínas em cada eixo, foram em regiões distintas. A rotação da proteína no eixo Y estabilizou-se em cerca de $3,95\text{ nm}$, no eixo Z em $4,43\text{ nm}$ e no eixo X em $4,85\text{ nm}$. Percebemos que não há mais uma estabilização do potencial após $5,8\text{ nm}$, sendo que após essa distância existe uma tendência de não existir mais as interações da HSA@AuNP2, pois o potencial converge a zero.

A figura 35 (B) mostra apenas os perfis dos maiores potenciais de interação, podemos perceber que existe uma inversão entre o maior potencial e a distância de estabilização na interação. O maior potencial foi obtido no eixo Y sendo $-6,4\text{ kcal.mol}^{-1}$, seguido pelo eixo Z com $-5,0\text{ kcal.mol}^{-1}$ e pelo eixo X com $-3,2\text{ kcal.mol}^{-1}$. Como já foi comentado anteriormente, nas discussões da LYS@AuNPs, existe uma tendência natural dos eixos Y e Z realizarem uma melhor varredura de superfícies, devido a metodologia empregada, permitindo probabilisticamente que esses obtenham os maiores potenciais.

Comparando a HSA@AuNP2 com a LYS@AuNP2 da figura 25, temos que a interação com a HSA obteve em todos os eixos os maiores potenciais, bem como as maiores distancias de estabilização entre os centroides, as maiores distancias são evidentes por se tratar de uma proteína maior. Para os maiores potenciais obtidos na HSA, podemos supor que esse esteja relacionado com superfície livre de interação, que nessa situação a quantidade de superfície livre esteve presente na proteína, já que temos a HSA com um tamanho maior que a AuNP2, como mostra na figura 36.

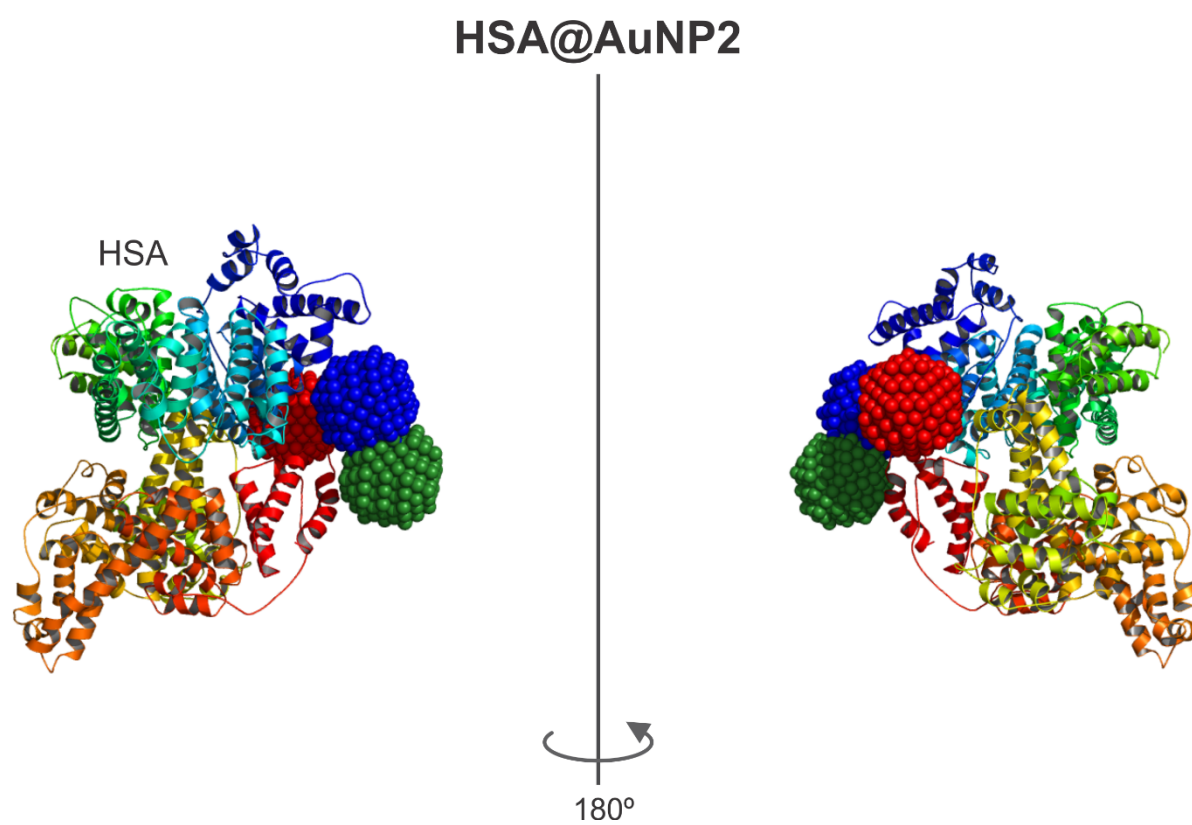
Na figura 36 percebemos três regiões de interação, onde os eixos X e Z estão bem próximos e o eixo Y mais afastado. O número de regiões de interação é um fator relevante para a formação da PC, entretanto pela figura 36 percebemos que o tamanho da AuNP2, frente a HSA impossibilita a interações de várias proteínas em sua superfície, não realizando uma interação de multicamadas densa, mas realizando apenas interações que permeiam a corona mole, não realizando a total cobertura da superfície da nanopartícula (PIELLA et al., 2017; LIU e PENG, 2017; CARRILLO-CARRION et al., 2017). A AuNP2 possui uma área de superfície de $12,56\text{ nm}^2$, sendo baixa frente a HSA, como é mostrada.

Figura 35: (A) Potenciais de energia de interação entre HSA@AuNP2. (B) Maiores potencias de interação da HSA@AuNP2.



Fonte: (AUTOR).

Figura 36: Posições de maior afinidade potencial na interação HSA@AuNP2.



Fonte: (AUTOR).

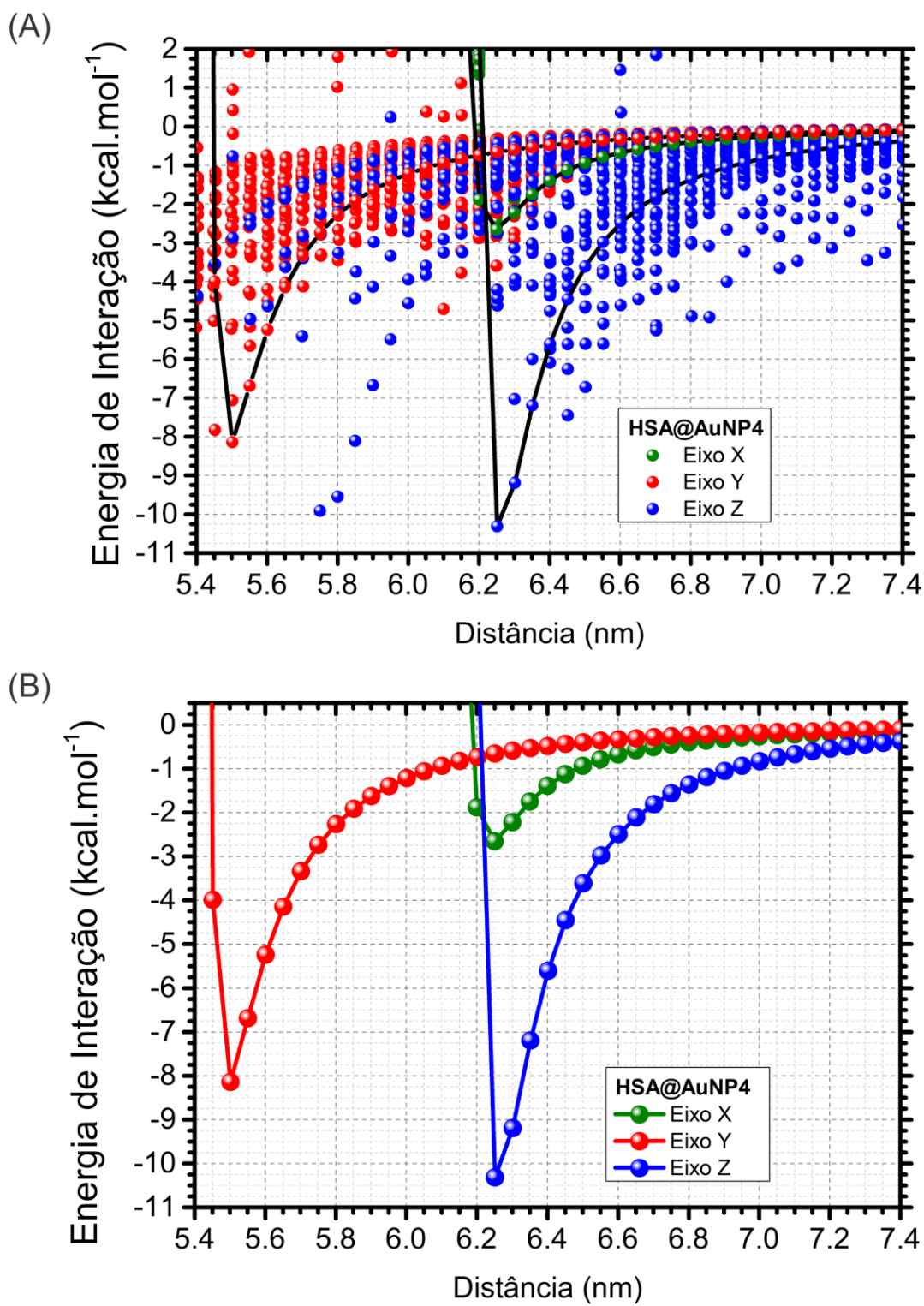
A figura 37 (A), mostra os energia de interação entre a HSA@AuNP4. O eixo Y teve a estabilização mais próxima entre os centroides com 5,5 nm, já os eixos X e Z estabilizaram-se ambas em torno de 6,25 nm. Na figura 37 (A) percebe-se vários perfis potenciais se formando, que entram em convergência após 7,4 nm.

A figura 37 (B), mostra apenas os potenciais que obtiveram os maiores valores (mínimos). Temos a rotação da proteína em Z, marcando o maior potencial com um valor de $-10,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$, seguida pelo eixo Y com $-8,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e o eixo X com $-2,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Comparando com a HSA@AuNP2, tivemos uma troca de eixo que obteve o maior potencial, já que na HSA@AuNP2, o maior potencial foi obtido no eixo Y. Além disso tivemos aumento potencial nos eixos Y e Z, e um potencial menor sendo apresentado no eixo X. Situações que podem ser discutidas apenas por parâmetros probabilísticos de encontro de regiões de mais fortes interações durante a rotação da proteína.

Na figura 37 (B), por mais que o eixo X tenha obtido um menor potencial quando comparado com a modelagem anterior, temos o eixo Z como o maior potencial obtido dentre as modelagens HSA@AuNPs, fato que foge do quesito de maior quantidade de superfície livre geraria uma maior afinidade de interações. Entretanto, esse maior potencial apresentado na HSA@AuNP4, não garante ser a nanopartícula que mais possibilita a formação da PC, já que outros quesitos devem ser preenchidos para esse fenômeno. Um alto potencial de energia de interação, garante uma forte ligação, mas para a formação da PC é necessário superfície livre para interações com outras proteínas, formando multicamadas densas, característica da corona dura (PIELLA et al., 2017; LIU e PENG, 2017; CARRILLO-CARRION et al., 2017). Logo, a figura 38, mostra que o tamanho da AuNP4 ($50,26 \text{ nm}^2$ de área superficial) frente a HSA ainda não permite a interação de várias proteínas permeando apenas fortes interações, que não garantem a formação de multicamadas. Comparando a HSA@AuNP4 com a LYS@AuNP4, percebemos que exceto o eixo X, os eixos Y e Z obtiveram maiores potenciais de interação.

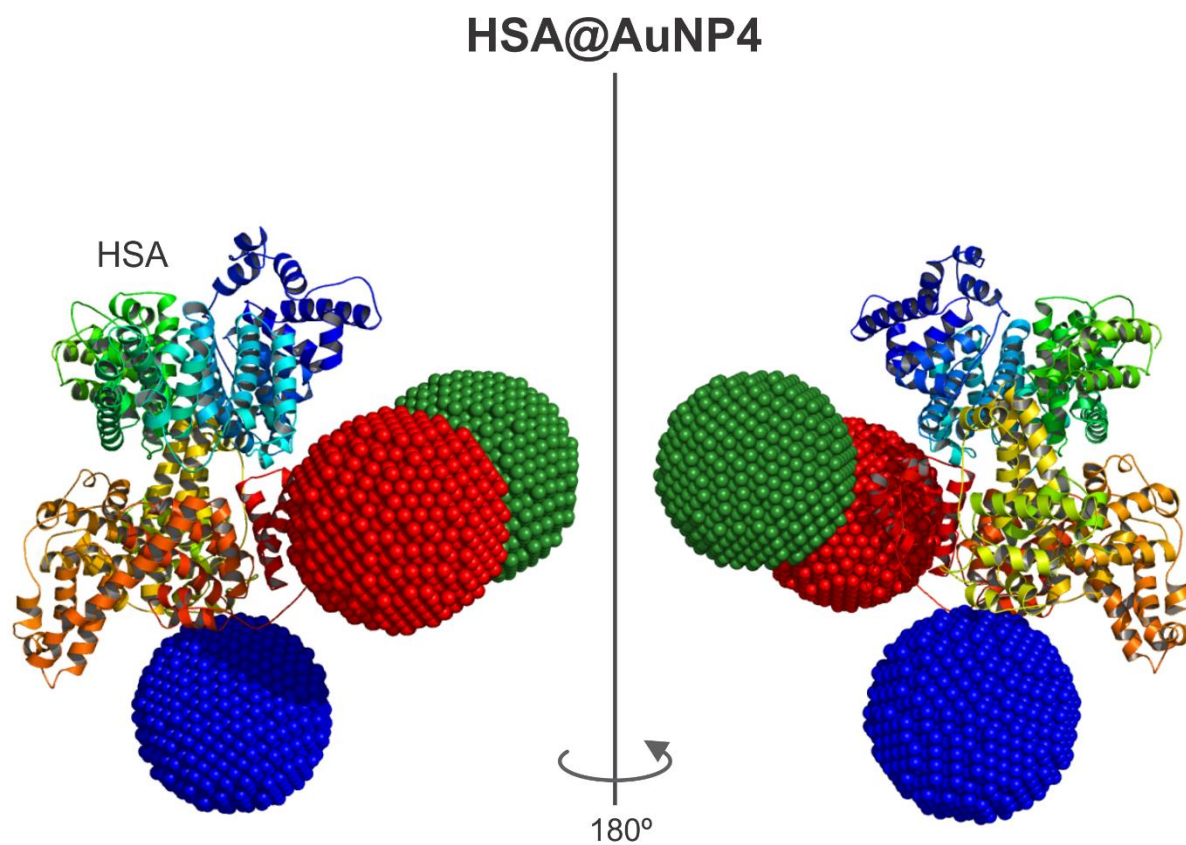
A figura 38, mostra as posições de maior afinidade potencial na interação da HSA@AuNP4. Percebemos três regiões distintas de interação, tendo as regiões de rotação X e Y bem próximas, ao passo que a rotação em Z distancia-se. Assim como foi discutido para HSA@AuNP2, que também apresentou três regiões de interação, mas com duas bem próximas, a quantidade de regiões de interação é um dos fatores que facilita a formação da PC (PIELLA et al., 2017; LIU e PENG, 2017; CARRILLO-CARRION et al., 2017).

Figura 37: (A) Potenciais de energia de interação entre HSA@AuNP4. (B) Maiores potências de interação da HSA@AuNP4.



Fonte: (AUTOR).

Figura 38: Posições de maior afinidade potencial na interação HSA@AuNP4.



Fonte: (AUTOR).

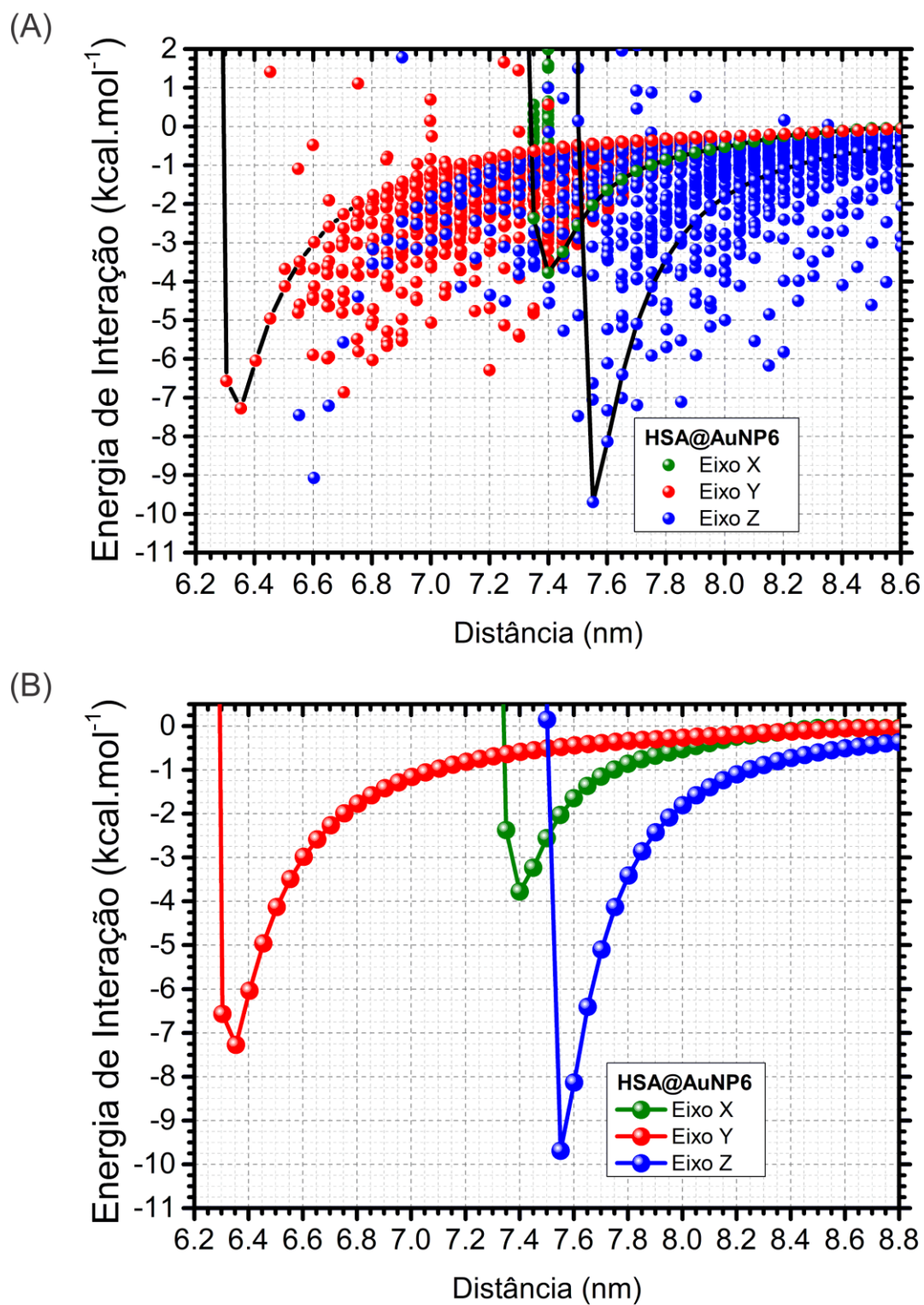
As energias de interação da HSA@AuNP6 são mostrados na figura 39 (A). Percebemos que assim como aconteceu na HSA@AuNP2 e na HSA@AuNP4, houve um afastamento entre os centroides de cada eixo durante a estabilização. A rotação da proteína no eixo Y estabilizou-se em $6,35\text{ nm}$, em X com $7,4\text{ nm}$ e em Z com $7,55\text{ nm}$, distâncias maiores que apresentadas nas modelagens anteriores graças ao aumento do diâmetro da nanopartícula em questão. Percebemos que os diversos potenciais começam a se convergir após $8,6\text{ nm}$, com tendência de não haver mais interações entre as duas moléculas, tendo a energia potencial convergindo a zero.

A figura 39 (B), mostra as curvas de interações separadas. O eixo Z obteve a maior energia potencial com $-9,8\text{ kcal.mol}^{-1}$, seguida pelo eixo Y com $-7,4\text{ kcal.mol}^{-1}$ e com o eixo X obtendo $-3,95\text{ kcal.mol}^{-1}$. Quando comparada com a HSA@AuNP2, a modelagem com a AuNP6 obteve em todos os eixos maiores energias potenciais tendo um acréscimo de cerca de $-2,0\text{ kcal.mol}^{-1}$ em cada eixo de rotação da proteína. Quando comparada a HSA@AuNP4 a modelagem HSA@AuNP6 obteve maior energia potencial apenas no eixo X, tendo os eixos Y e Z sendo superados pela HSA@AuNP4. Entretanto, como já foi discutido o valor numérico da energia potencial de interação não pode ser exclusivamente conclusivo para a formação da PC, tendo a superfície livre, e a quantidade de regiões de interação como outros dados relevantes. A AuNP6 por sua vez apresenta uma maior superfície livre, tendo $113,09\text{ nm}^2$ quando compara a AuNP4 que possui $50,26\text{ nm}^2$.

Em uma comparação com a LYS@AuNP6, notamos que houve um aumento na energia de interação no eixo Z saindo de $-9,3\text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-9,8\text{ kcal.mol}^{-1}$ e no eixo X saindo de $-3,8\text{ kcal.mol}^{-1}$ para $-3,95\text{ kcal.mol}^{-1}$, já no eixo Y a LYS obteve um maior potencial com -8 kcal.mol^{-1} .

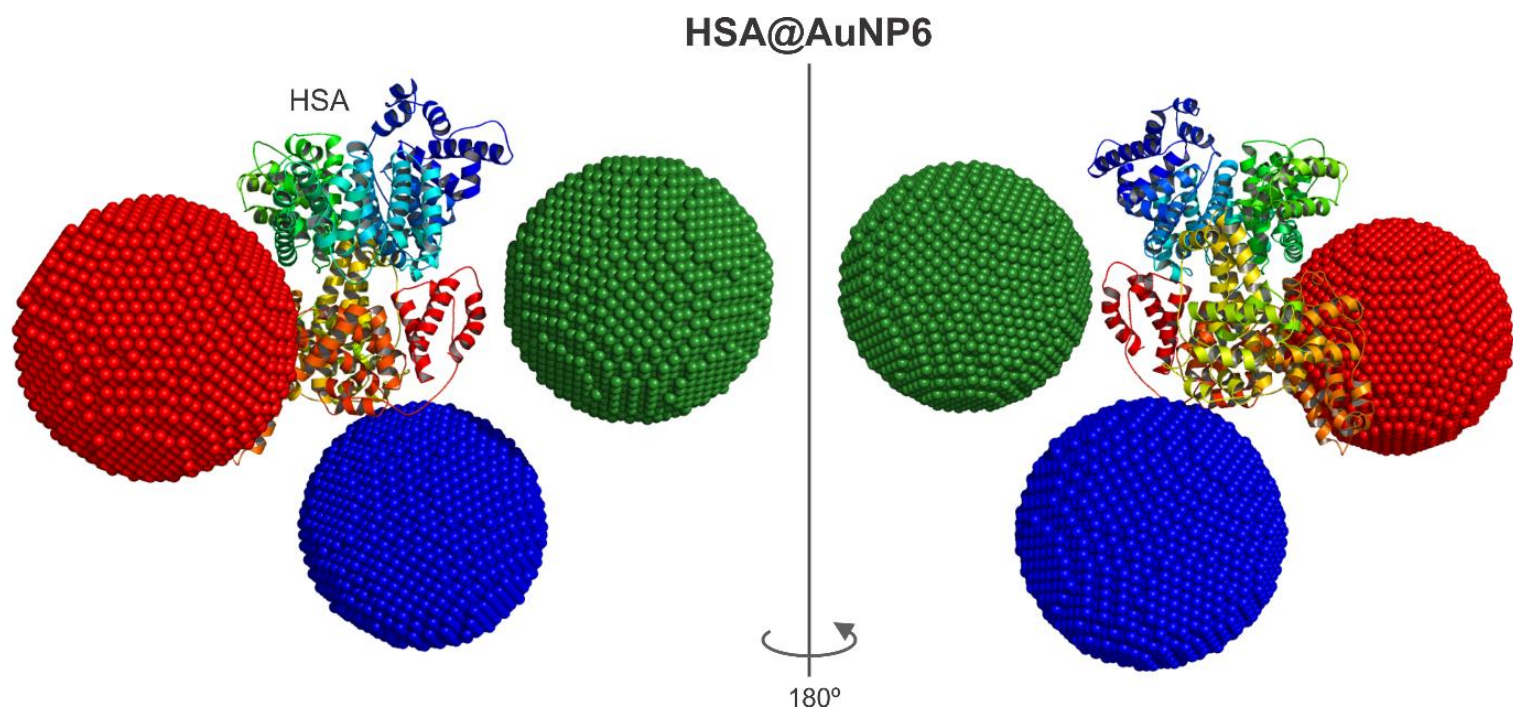
A figura 40, mostra as posições de maior afinidade potencial na interação da HSA@AuNP6. Percebemos que assim como foi mostrado nas outras duas interações da HSA, nesta também são apresentadas três regiões de maior afinidade potencial. Entretanto, ao contrário da HSA@AuNP2 e HSA@AuNP4, notamos três regiões bem distintas, sem muita proximidade entre dois eixos. Também conseguimos notar visualmente que esse tamanho de nanopartícula junto a HSA já mostra-se capaz de receber interações de outras proteínas, pois apresenta maior superfície livre, fato que aumenta a probabilidade de formação do efeito corona, bem como a PC (PIELLA et al., 2017; LIU e PENG, 2017; CARRILLO-CARRION et al., 2017).

Figura 39: (A) Potenciais de energia de interação entre HSA@AuNP6. (B) Maiores potencias de interação da HSA@AuNP6.



Fonte: (AUTOR).

Figura 40: Posições de maior afinidade potencial na interação HSA@AuNP6.



Fonte: (AUTOR).

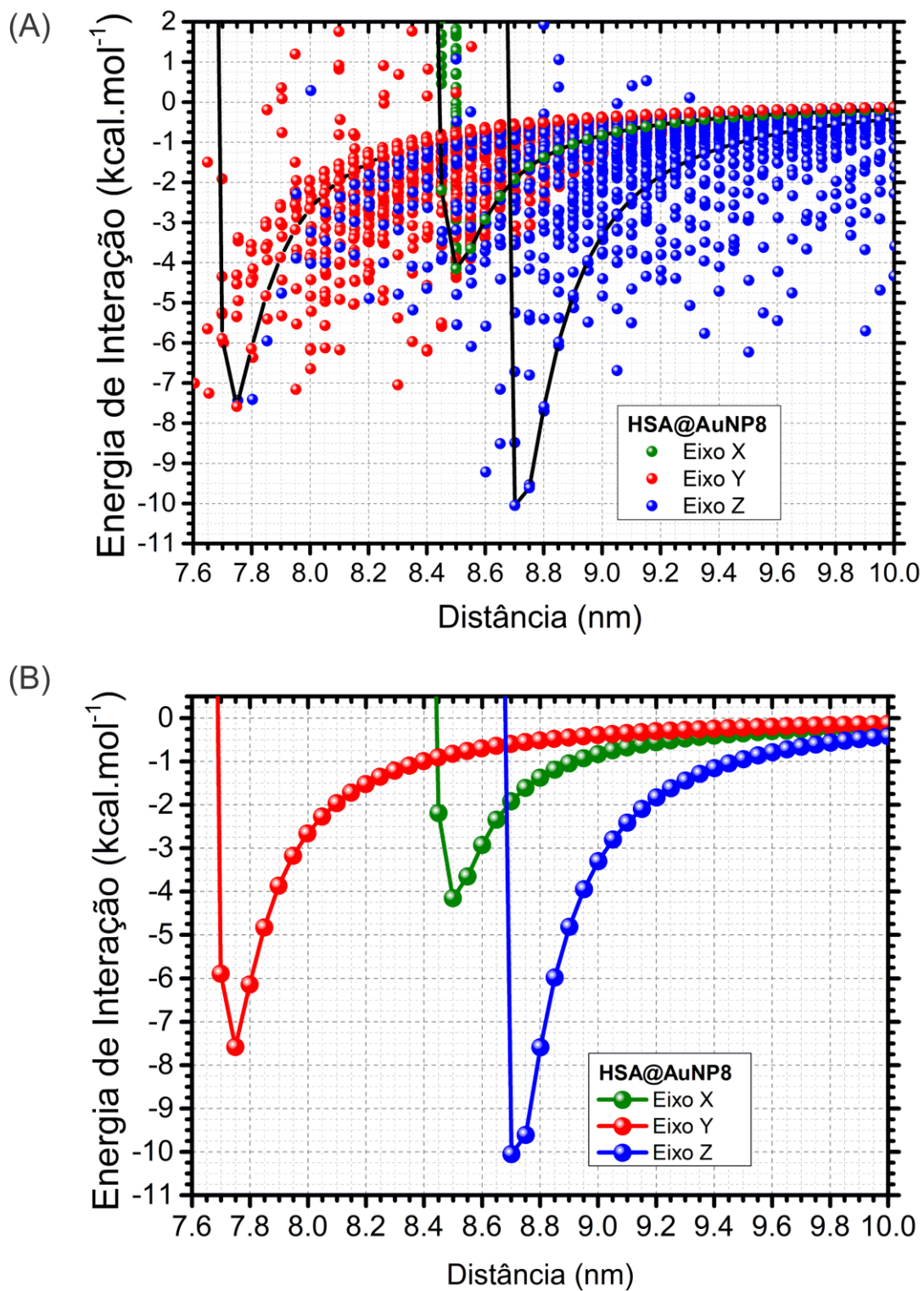
A figura 41 (A), as energias de interação entre a HSA@AuNP8, ultima sistema modelado neste pesquisa. Vale destacar, que foi uma modelagem que gerou um alto custo computacional, pois tratou-se de duas grandes moléculas. Pela figura 41 (A), observamos diversos potenciais sendo formados, que convergem com seus poços entre 7,65 nm e 8,65 nm, não possuindo mais altos poços potenciais após 10 nm, tendo a tendência de diminuir a quantidade de interações com o potencial convergindo a zero.

A figura 41 (B), mostra separadamente os perfis potenciais de cada eixo. O eixo Y estabilizou-se em cerca de 7,7 nm com uma energia potencial de $-7,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, o eixo X estabilizou-se em 8,5 nm com um potencial de $-4,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e o eixo Z tendo a maior energia potencial em 8,7 nm com $-10 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Quando comparada com as outras modelagens realizadas da HSA, apenas o eixo Z da HSA@AuNP4 obteve um maior potencial, sendo ele o maior para as modelagens da HSA, todos os outros potenciais foram abaixo dos apresentados na HSA@AuNP8, sendo um forte quesito para formação da PC.

Em uma comparação com a LYS@AuNP8, a HSA@AuNP8 obteve menores potenciais em todos os eixos, tendo $-4,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o eixo X contra $-4,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ da LYS, $-7,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o eixo Y contra $-11,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$, e $-10 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o eixo Z contra $-11,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ da LYS. Mostrando que o fator tamanho da AuNP teve maior influência para a LYS frente a HSA, fato que pode ser explicado pela proximidade de tamanhos, a HSA com a AuNP8 tem tamanhos próximos, figura 42, caso que não acontece na LYS com a AuNP8. O tamanho diferente da proteína frente a nanopartícula gera superfície livre, tanto para uma maior interação potencial quanto para uma maior agregação de outras proteínas, fator relevante para a formação da PC.

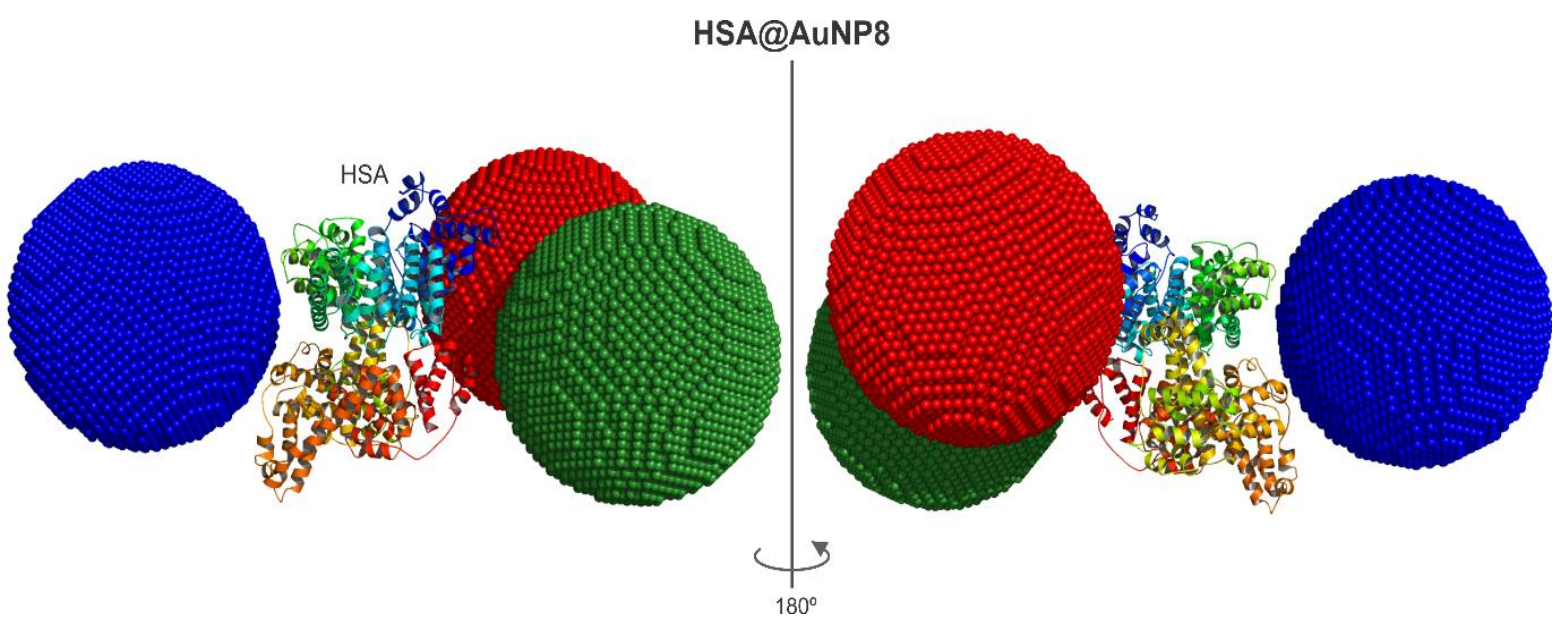
A figura 42, mostra as posições de maior afinidade na interação HSA@AuNP8. Podemos perceber mais uma vez a formação de três regiões preferenciais, e que temos novamente a proximidade de regiões entre dois eixos, X e Y, como aconteceu nas modelagens HSA@AuNP2 e HSA@AuNP4. Percebemos que existe uma proximidade de tamanho da AuNP8 quando comparada com a HSA. A AuNP8 possui uma área superficial de $201,06 \text{ nm}^2$ que permite a interação de outras proteínas em sua superfície, sendo esse um fator primordial para a formação da PC, superando uma maior energia de interação como é mostrada na modelagem HSA@AuNP4.

Figura 41: (A) Potenciais de energia de interação entre HSA@AuNP8. (B) Maiores potências de interação da HSA@AuNP8.



Fonte: (AUTOR).

Figura 42: Posições de maior afinidade potencial na interação HSA@AuNP8.

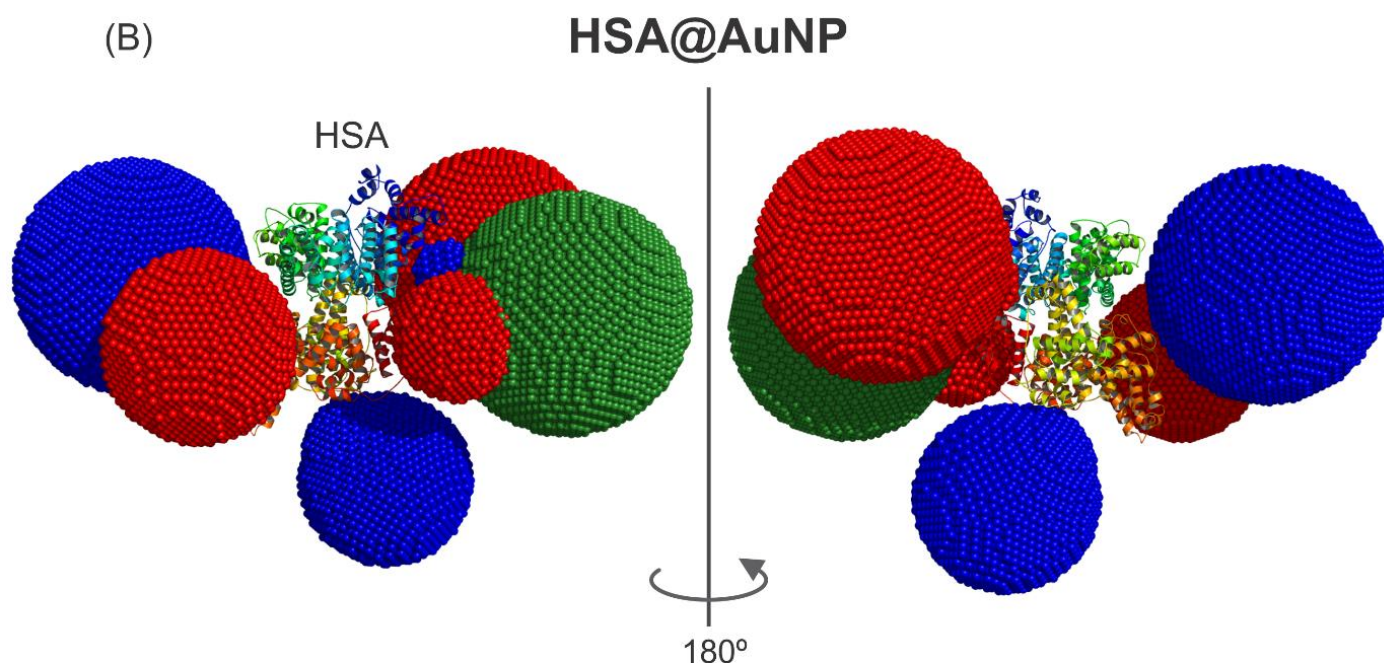
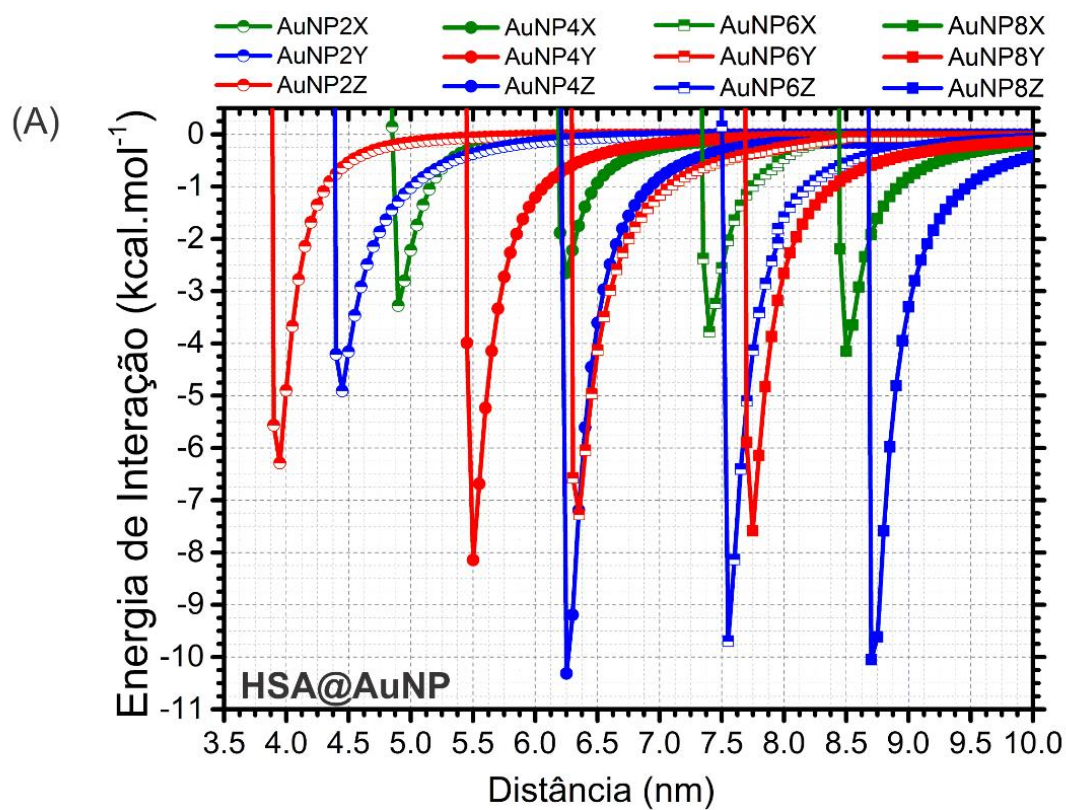


Fonte: (AUTOR).

Os maiores potenciais de interação dentre todos os eixos modelados da HSA@AuNPs é mostrado na figura 43 (A). Ao contrário de todas as modelagens apresentadas na LYS@AuNPs, não existe uma tendência natural de aumento de energia potencial com o aumento da nanopartícula, essa tendência é interrompida pela AuNP4Z que apresenta o maior potencial.

É possível notar que não existe uma separação muito bem definida de estabilização dos três eixos em cada tamanho de nanopartícula, fato que acontece na LYS@AuNPs. Percebemos que as distâncias dos centroides de cada AuNP com a proteína, são bem distribuídos em cada tamanho. Todas as regiões de interações que foram apresentadas na modelagem da HSA@AuNPs são mostradas na figura 43 (B). Percebemos que existem sobreposições de nanopartículas que se estabilizam em iguais regiões, havendo assim uma formação de três regiões preferenciais dentre todos os diâmetros apresentados.

Figura 43: (A) Maiores potencias de interação dentre todos os eixos modelados da HSA@AuNPs. (B) Posições de maior afinidade potencial dentre todos os eixos na interação HSA@AuNPs.



Fonte: (AUTOR).

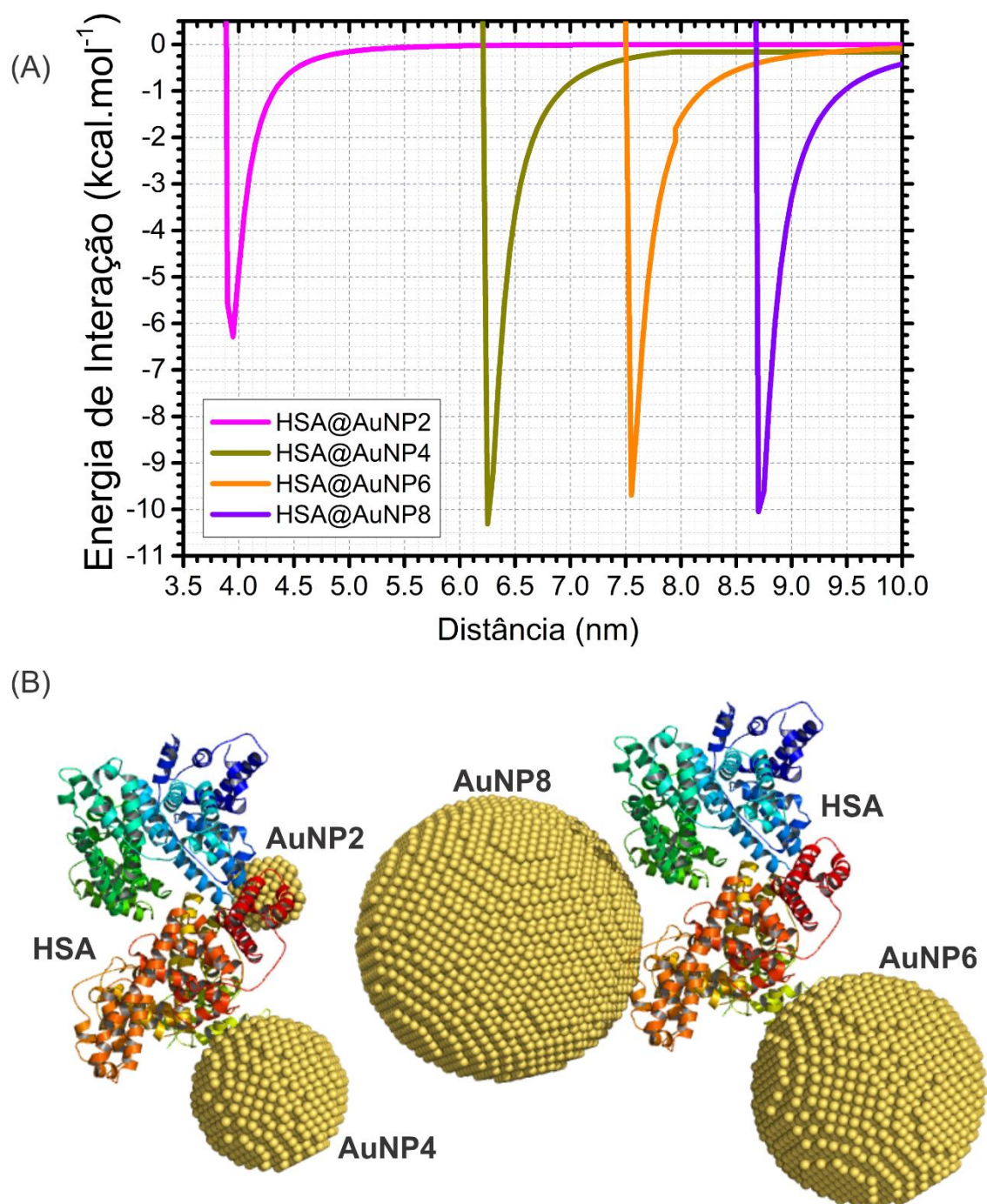
Os maiores potenciais da HSA@AuNPs, são apresentados na figura 44 (A). É mostrado que dentre as nanopartículas estudadas com a HSA, o maior potencial de interação foi apresentado na AuNP4, entretanto, não podemos destaca-la como a nanopartícula que seria mais susceptível a PC, pois quando comparada com a HSA a AuNP4 não apresenta tamanho favorável para superfície livre. É provável que a AuNP8 seja a nanopartícula mais aderente a PC, que embora não possua a maior energia potencial de interação, possui superfícies livres frente a HSA permitindo uma interação com diversas proteínas com formação de multicamadas, que se tornam densas e transitam-se pelo efeito *Vroman* até a formação da corona dura (PIELLA et al., 2017; LIU e PENG, 2017; CARRILLO-CARRION et al., 2017).

Ao contrário da figura 43 (B), que mostra todas as possíveis regiões de interação, a figura 44 (B) mostra apenas as três regiões preferenciais de interação de cada nanopartícula, onde acontece as maiores energias potenciais, sendo apresentado em três regiões distintas, onde a AuNP4 é sobreposta na mesma região da AuNP6, na qual podemos pressupor probabilisticamente que elas estão envolvidas nas mesmas ligações, embora aja uma necessidade de maior investigação.

Na modelagem da HSA@AuNPs, é possível notar uma convergência de aumento potencial a partir da nanopartícula de 4 nm, que apesar de apresentar o maior valor, esse mostra-se muito próximo aos apresentados nas AuNPs de 6 e 8 nm, podendo esses serem considerados apenas como uma flutuação numérica. Essa convergência de energia potencial pode ser derivada de não haver mais novas interações químicas após o diâmetro de 4 nm.

Alguns artigos relatam a preferência de interação de proteínas com AuNPs esféricas em sítios de interação que possuem a presença do aminoácido cisteína (AJDARI e colab., 2017; BRAUN e colab., 2016; LIU e PENG, 2017; RAMEZANI e colab., 2014). Como foi apresentado na fundamentação a HSA possui 35 resíduos de cisteína (Cys), que estão envolvidos em ligações dissulfeto estabilizando a estrutura da HSA, com exceção da Cys34 no domínio I (YANG e colab., 2014), logo podemos pressupor que as regiões preferenciais apresentadas na figura 56 podem possuir essas interações. Uma possível interação das nanopartículas nesses sítios enzimáticos, a proteína perderia sua função, sendo apenas um agente encapsulam-te, fator que fortalece a interação envolvida proporcionando a formação da corona, com a formação de multicamadas de proteínas (BRAUN e colab., 2016; CHARBGOO e colab., 2018; DING e MA, 2014; KHARAZIAN e colab., 2016; PIELLA e colab., 2017). Entretanto, há uma necessidade de maior investigação nessa linha de discussão.

Figura 44: (A) Maiores potencias da HSA@AuNPs. B) Posições de maior afinidade na interação HSA@AuNPs.



Fonte: (AUTOR).

5. CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados obtidos podemos notar que energia de interação do sistema LYS@AuNPs apresentaram uma proporcionalidade entre o aumento do tamanho das nanopartículas com o aumento da energia potencial de interação, sendo a LYS@AuNP8 o maior potencial apresentado. As interações tiveram três regiões preferenciais, na qual a AuNP8 se sobrepôs a AuNP6. A LYS@AuNP8 foi considerada a mais propensa na formação da corona dura, já que possui superfície livre para interação com outras proteínas bem como uma forte energia de interação, sendo um tamanho a ser evitado caso necessite manter a característica da nanopartícula.

Já no sistema HSA@AuNPs não houve uma proporcionalidade aparente de aumento do tamanho da nanopartícula com o aumento da energia potencial de interação, sendo a HSA@AuNP4 o maior potencial apresentado. As interações também tiveram três regiões preferenciais, onde a AuNP6 se sobrepôs a AuNP4. Embora não tenha tido o maior potencial apresentado, a HSA@AuNP8, também foi considerada a mais propensa a formação da corona dura, pois frente a HSA é a que mais apresenta superfície livre, sendo novamente um tamanho a ser evitado.

Um fator a ser levado em consideração na influência dos perfis de interação da nanopartículas com proteínas são suas geometrias, fato evidenciado no trabalho. Apesar do nosso modelo considerar as proteínas rígidas conseguimos encontrar as possíveis regiões de interações.

Dentro dessa pesquisa, a AuNP2 seria a que mais evitaria a formação do efeito corona e da PC, sendo uma nanopartícula que não permite superfície livre tanto para LYS quanto para a HSA, bem como não possui altos valores de energia potencial de interação, quando comparada a AuNP4, AuNP6 e AuNP8. Sendo assim uma ótima escolha de transportador de fármaco que conserve suas características iniciais.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, Bashir e colab. **Phytofabricated gold nanoparticles and their biomedical applications**. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 89, p. 414–425, 2017.
- AJDARI, Niloofar e colab. **Gold nanoparticle interactions in human blood: a model evaluation**. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 13, n. 4, p. 1531–1542, 2017.
- ALAI, Milind Sadashiv e LIN, Wen Jen e PINGALE, Shailaja Suresh. **Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery**. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 23, n. 3, p. 351–358, 2015.
- ANGIOLETTI-UBERTI, Stefano. **Theory, simulations and the design of functionalized nanoparticles for biomedical applications: A Soft Matter Perspective**. *npj Computational Materials*, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2017.
- ANTONOV, Yuriy A. e colab. **Macromolecular complexes of lysozyme with kappa carrageenan**. *Food Hydrocolloids*, v. 74, p. 227–238, 2018.
- BAPAT, Gandhali e colab. **Silica nanoparticle based techniques for extraction, detection, and degradation of pesticides**. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 237, p. 1–14, 2016.
- BHAT, Imtiyaz Ahmad e ROY, Bibhisan e KABIR-UD-DIN. **Synthesis and biophysical analysis of a novel gemini surfactant with lysozyme: Industrial perspective**. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 63, p. 348–358, 2018.
- BRAUN, Nicholas J. e colab. **Modification of the protein corona-nanoparticle complex by physiological factors**. *Materials Science and Engineering C*, v. 64, p. 34–42, 2016.
- CARRILLO-CARRION, Carolina e CARRIL, Monica e PARAK, Wolfgang J. **Techniques for the experimental investigation of the protein corona**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 46, n. Figure 1, p. 106–113, 2017.
- CARVALHO, Ivone e colab. **Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica**. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 428–438, 2003.
- CHAKRABORTI, Soumyananda e colab. **Interaction of polyethyleneimine-functionalized ZnO nanoparticles with bovine serum albumin**. *Langmuir*, v. 28, n. 30, p. 11142–11152, 2012.
- CHARBGOO, Fahimeh e colab. **Gold nanoparticle should understand protein corona for being a clinical nanomaterial**. *Journal of Controlled Release*, v. 272, n. October 2017, p. 39–53, 2018.
- DAS, Rashmita e BANDYOPADHYAY, Rajib e PRAMANIK, Panchanan. **Carbon quantum dots from natural resource: A review**. *Materials Today Chemistry*, v. 8, p. 96–109, 2018.
- DE DIOS, Alejandro Simón e DÍAZ-GARCÍA, Marta Elena. **Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects**. *Analytica Chimica Acta*, v. 666, n. 1–2, p. 1–22, 2010.
- DING, Hong ming e MA, Yu qiang. **Computer simulation of the role of protein corona in**

cellular delivery of nanoparticles. *Biomaterials*, v. 35, n. 30, p. 8703–8710, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.033>>.

DOCTER, Dominic e colab. **Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles.** *Nature Protocols*, v. 9, n. 9, p. 2030–2044, 2014.

DREADEN, Erik C. e colab. **The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine.** *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 7, p. 2740–2779, 2012.

ELAHI, Narges e KAMALI, Mehdi e BAGHERSAD, Mohammad Hadi. **Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review.** *Talanta*, v. 184, n. February, p. 537–556, 2018.

FRIMMEL, Hartwig E. **Episodic concentration of gold to ore grade through Earth's history.** *Earth-Science Reviews*, v. 180, n. March, p. 148–158, 2018.

GORYACHEVA, O. A. e MISHRA, P. K. e GORYACHEVA, I. Yu. **Luminescent quantum dots for miRNA detection.** *Talanta*, v. 179, n. September 2017, p. 456–465, 2018.

GRILLO, Renato e ROSA, André H. e FRACETO, Leonardo F. **Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art.** *Chemosphere*, v. 119, p. 608–619, 2015.

GUL, Anum e colab. **Rutin and rutin-conjugated gold nanoparticles ameliorate collagen-induced arthritis in rats through inhibition of NF- κ B and iNOS activation.** *International Immunopharmacology*, v. 59, n. November 2017, p. 310–317, 2018.

HARRIS, Celina M. e colab. **Quantitative measurement of sodium polystyrene sulfonate adsorption onto CTAB capped gold nanoparticles reveals hard and soft coronas.** *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 510, p. 39–44, 2018.

HEIKKILÄ, Elena e colab. **Atomistic Simulations of Functional Au 144 (SR) 60 Gold Nanoparticles in Aqueous Environment.** *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 116, n. 17, p. 9805–9815, 2012.

JAFARI, Samira e colab. **Biomedicine & Pharmacotherapy Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic / diagnostic applications.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 109, n. August 2018, p. 1100–1111, 2019.

JO, Sung Duk e colab. **Harnessing designed nanoparticles: Current strategies and future perspectives in cancer immunotherapy.** *Nano Today*, v. 17, p. 23–37, 2017.

KASITHEVAR, Muthupandi e colab. **Antibacterial efficacy of silver nanoparticles against multi-drug resistant clinical isolates from post-surgical wound infections.** *Microbial Pathogenesis*, v. 107, p. 327–334, 2017.

KAUFMANN, Stefan H E. **Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis.** *The New England journal of medicine*, v. 353, n. 23, p. 2423–2426, 2005.

KHARAZIAN, B. e HADIPOUR, N. L. e EJTEHADI, M. R. **Understanding the nanoparticle-protein corona complexes using computational and experimental methods.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 75, p. 162–174, 2016.

KLIPPSTEIN, Rebecca e POZO, David. **Nanotechnology-based manipulation of dendritic cells for enhanced immunotherapy strategies.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and*

Medicine, v. 6, n. 4, p. 523–529, 2010.

LAI, Wenjia e colab. **Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: Analysis of protein corona reveals specific binding patterns.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 152, p. 317–325, 2017.

LAM, Shu J. e colab. **Antimicrobial polymeric nanoparticles.** Progress in Polymer Science, v. 76, p. 40–64, 2018.

LIU, Jingying e PENG, Qiang. **Protein-gold nanoparticle interactions and their possible impact on biomedical applications.** Acta Biomaterialia, v. 55, p. 13–27, 2017.

MAHMOUDI, Morteza e colab. **Protein-nanoparticle interactions: Opportunities and challenges.** Chemical Reviews, v. 111, n. 9, p. 5610–5637, 2011.

MASUDA, Hiroaki e colab. **Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles.** [S.l.]: Elsevier B.V., 2008.

MERUM, Sireesha e VELURU, Jagadeesh Babu e SEERAM, Ramakrishna. **Functionalized carbon nanotubes in bio-world: Applications, limitations and future directions.** Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology, v. 223, p. 43–63, 2017.

MEUNIER, V. e colab. **Physical properties of low-dimensional sp²-based carbon nanostructures.** Reviews of Modern Physics, v. 88, n. 2, p. 1–50, 2016.

MISHRA, Pratik e colab. **Facile bio-synthesis of gold nanoparticles by using extract of Hibiscus sabdariffa and evaluation of its cytotoxicity against U87 glioblastoma cells under hyperglycemic condition.** Biochemical Engineering Journal, v. 105, p. 264–272, 2016.

MURPHY, Catherine J. e colab. **The many faces of gold nanorods.** Journal of Physical Chemistry Letters, v. 1, n. 19, p. 2867–2875, 2010.

NARANG, Jagriti e colab. **Electrochemical impedimetric detection of anti-HIV drug taking gold nanorods as a sensing interface.** Biosensors and Bioelectronics, v. 66, p. 332–337, 2015.

O'CONNOR, Fergal A. e colab. **The financial economics of gold - A survey.** International Review of Financial Analysis, v. 41, p. 186–205, 2015.

OCHYL, Lukasz J. e colab. **Chemo-photothermal therapy combination elicits anti-tumor immunity against advanced metastatic cancer.** Nature Communications, v. 9, n. 1, 2018.

PENG, Qiang e MU, Huiling. **The potential of protein-nanomaterial interaction for advanced drug delivery.** Journal of Controlled Release, v. 225, p. 121–132, 2016.

PIELLA, Jordi e BASTÚS, Neus G. e PUNTES, Víctor. **Size-dependent protein-nanoparticle interactions in citrate-stabilized gold nanoparticles: The emergence of the protein corona.** Bioconjugate Chemistry, v. 28, n. 1, p. 88–97, 2017.

RAJKUMAR, S e PRABAHARAN, M. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Multifunctional core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticles for cancer diagnosis and therapy.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 174, n. September 2018, p. 252–259, 2019.

RAMEZANI, Fatemeh e AMANLOU, Massoud e RAFII-TABAR, Hashem. **Gold nanoparticle shape effects on human serum albumin corona interface: A molecular dynamic study**. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 16, n. 7, 2014.

ROSSI, Giulia e MONTICELLI, Luca. **Gold nanoparticles in model biological membranes: A computational perspective**. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1858, n. 10, p. 2380–2389, 2016.

SAEED, Ahmed e THAHIRA, Umme. **Physica B: Condensed Matter Synthesis and characterization of stable silver nanoparticles, Ag-NPs: Discussion on the applications of Ag-NPs as antimicrobial agents**. *Physica B: Physics of Condensed Matter*, v. 554, n. November 2018, p. 21–30, 2019.

SANT'ANNA, Carlos Mauricio R. **Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction**. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, 2009.

SASIDHARAN, Abhilash e RIVIERE, Jim E. e MONTEIRO-RIVIERE, Nancy A. **Gold and silver nanoparticle interactions with human proteins: Impact and implications in biocorona formation**. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 3, n. 10, p. 2075–2082, 2015.

SHAO, Zhufeng e colab. **Photon-induced interfacial charge transfer mechanism of porous silicon/TiO₂ nanoparticles for photoelectrochemical performance**. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 338, p. 72–84, 2017.

SHEIKHPOUR, Mozghan e GOLBABAIE, Ali e KASAEIAN, Alibakhsh. **Carbon nanotubes: A review of novel strategies for cancer diagnosis and treatment**. *Materials Science and Engineering: C*, v. 76, p. 1289–1304, 2017.

VÁCHA, Robert e MARTINEZ-VERACOECHEA, Francisco J. e FRENKEL, Daan. **Receptor-mediated endocytosis of nanoparticles of various shapes**. *Nano Letters*, v. 11, n. 12, p. 5391–5395, 2011.

WANG, Mengmeng e colab. **Probing the mechanism of plasma protein adsorption on Au and Ag nanoparticles with FT-IR spectroscopy**. *Nanoscale*, v. 7, n. 37, p. 15191–15196, 2015.

WANG, Wei e NEMA, Sandeep e TEAGARDEN, Dirk. **Protein aggregation — Pathways and influencing factors**. v. 390, p. 89–99, 2010.

XU, Zhen e colab. **Adsorption of histidine and histidine-containing peptides on Au(111): A molecular dynamics study**. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 380, n. 1–3, p. 135–142, 2011.

YANG, Feng e ZHANG, Yao e LIANG, Hong. **Interactive association of drugs binding to human serum albumin**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 3, p. 3580–3595, 2014.

YOON, Hong Yeol e colab. **Engineering nanoparticle strategies for effective cancer immunotherapy**. *Biomaterials*, 2018.

ZHAO, Yanhua e colab. **Label-free ECL immunosensor for the early diagnosis of rheumatoid arthritis based on asymmetric heterogeneous polyaniline-gold nanomaterial**. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 257, p. 354–361, 2018. Disponível em:

ZHDANOV, Vladimir P. **AC**. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2018.