

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**ESTUDO FÍSICOQUÍMICO DA ASSOCIAÇÃO DO
INIBIDOR DE SERINOPROTEASES BTCI COM
FLUIDO MAGNÉTICO**

Mary-Ann Elvina Xavier

**Brasília
2012**

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**ESTUDO FÍSICOQUÍMICO DA ASSOCIAÇÃO DO
INIBIDOR DE SERINOPROTEASES BTCI COM
FLUIDO MAGNÉTICO**

Mary-Ann Elvina Xavier

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zulmira Guerrero Marques Lacava
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Maria de Freitas

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal da Universidade de
Brasília, como parte integrante dos
requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Biologia Animal.

Brasília

2012

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado....

À minha querida mãe Edite por seu enorme amor, cuidado e incentivo, que me ajudam a trilhar o meu caminho e alcançar os meus objetivos.

Ao meu amável pai Samiro pelos ensinamentos e educação que permitiram me constituir como ser humano.

Aos meus três irmãos, Barry, Kendrick e Christabelle-Ann que acreditam no meu potencial e são para mim exemplos de perseverança e superação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu amor perfeito e misericordioso e por todas as bênçãos derramadas na minha vida e na da minha família.

À minha doce orientadora profa. Zulmira Lacava, exemplo de pesquisadora, por seus ensinamentos e oportunidades oferecidos a mim desde o segundo semestre da minha graduação. Obrigada por ter propiciado o meu crescimento profissional e ter acreditado no meu trabalho.

À minha querida co-orientadora profa. Sonia Maria de Freitas, exemplo de profissional e dedicação à pesquisa, pela amizade, paciência e oportunidade. Obrigada por todos os ensinamentos e vivências compartilhadas que permitem o meu crescimento como pessoa.

Às minhas amigas Letícia Braga, Marcela Manara, Gabriela Teixeira e Carolina Musso por estarem sempre prontas para me ajudar, ouvir e participar de todos os projetos da minha vida. Obrigada pelos anos de amizade e por todos os ensinamentos e momentos compartilhados. Amo todas vocês.

À Carlinha, Caio, Everton, Giselle e Graziella pelo companheirismo, ensinamentos e carinho que demonstraram desde o início da nossa convivência e amizade.

À Alice, Muriele, Daniella e Amanda pela convivência no laboratório e por fazerem parte da construção dessa dissertação. Obrigada por terem me acolhido no laboratório de Biofísica.

Ao Diego-Ann, William-Boy e Jonny-Boy por serem os meus filhotes favoritos e estarem sempre demonstrando o carinho e companheirismo por mim. Obrigada por serem essas pessoas tão amáveis.

Ao pessoal do laboratório de Física: Prof. Paulo César Morais, Cléver Stein e Fernando pela participação nesse projeto. Agradeço ao professor Kalil Skeff Neto por todos os ensinamentos e conversas sobre a vida acadêmica.

Aos meus amigos Natália Lemos, Natália Bittencourt e Raphael por toda a ajuda, conversas e conselhos. Obrigada por estarem no meu caminho.

Agradecimento especial para seu Chico que com sua indispensável colaboração para o laboratório de Biofísica Estrutural permitiu que essa tese fosse realizada. Valeu Seu Chico!

RESUMO

Com o intuito de desenvolver novos materiais para tratamento do câncer, o objetivo deste trabalho foi associar dois componentes, sendo um com atividade anticarcinogênica comprovada: o BTCI e nanopartículas de maghemita recobertas por dextrana (MagDex) e caracterizar magnética e biofisicamente o complexo formado. A atividade antitumoral do BTCI foi comprovada contra células MCF-7 e essa molécula associada às nanopartículas biocompatíveis pode ser direcionada para um local sítio específico e lisar células tumorais no processo de magnetohipertermia. A caracterização do complexo foi feita pelos métodos: microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, espalhamento de luz dinâmico (diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e polidispersividade), fluorescência (número de sítios e constante de associação), dicroísmo circular, ensaios enzimáticos colorimétricos para avaliação da atividade inibitória do BTCI, birrefringência magnética estática, ensaios de associação do inibidor. De acordo com análises de diâmetro hidrodinâmico, o BTCI complexou com as nanopartículas de MagDex. A constante de associação do complexo foi de 10^4 M^{-1} em pH 4,0 e 10^3 M^{-1} em pH 7,4 e pH 10,0. Segundo os parâmetros termodinâmicos, nessas três condições de pH, a associação do complexo foi espontânea, dirigida entropicamente com contribuições de associações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. A associação de BTCI a MagDex não alterou o conteúdo das estruturas secundárias, nem a atividade inibitória do BTCI complexado contra suas enzimas cognatas de forma expressiva. Adicionalmente, BTCI-MagDex manteve as características magnéticas de MagDex, como a maior resposta de susceptibilidade magnética a campos de (300 Oe), mesmo após diluições. O ensaio de sedimentação magnética sugere que 80% do BTCI associa às nanopartículas. Em conclusão, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que BTCI-MagDex apresenta características físico-químicas que favorecem a estabilidade e atividade do BTCI e a manutenção das propriedades magnéticas das nanopartículas, condição esta que é fundamental para estudos futuros que visem a aplicação desse sistema na terapia contra o câncer.

ABSTRACT

In order to develop new materials for the treatment of cancer, the objective was to associate two components, one with proven anticancer activity: the BTCl and maghemite nanoparticles coated with dextran (MagDex) and magnetic and biophysically characterize the complex formed. The antitumor activity of BTCl was proven against MCF-7 cells and this molecule associated with biocompatible nanoparticles can be targeted to a specific site location and kill tumor cells in the process of magnetohyperthermia. The characterization of the complex was made by the methods: transmission electron microscopy and scanning electron microscopy, dynamic light scattering (hydrodynamic diameter, zeta potential and polydispersity), fluorescence (number of sites and association constant), circular dichroism, enzymatic colorimetric assays for assessment inhibitory activity of BTCl, static magnetic birefringence, tests of association of the inhibitor. According to analysis of hydrodynamic diameter, BTCl formed a complex with MagDex nanoparticles. The association constant of the complex was 10^4 M^{-1} at pH 4.0 and 10^3 M^{-1} at pH 7.4 and pH 10.0. According to the thermodynamic parameters, these three pH conditions, the association of the complex was spontaneous, entropically driven with contributions from hydrophobic associations and hydrogen bonding. The association of BTCl-MagDex did not alter the content of secondary structures, nor the inhibitory activity of the complexed BTCl against their cognate enzymes significantly. Additionally, BTCl-MagDex kept MagDex magnetic characteristics, such as susceptibility response to magnetic fields (300 Oe), even after dilution. The test of magnetic sedimentation suggests that 80% of BTCl associated with nanoparticles. In conclusion, the results suggest that BTCl-MagDex has physicochemical characteristics that favor the stability and activity of BTCl and maintenance of the magnetic properties of nanoparticles, a condition which is critical for future studies aimed at applying this system in therapy against cancer.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Perfil cromatográfico da purificação de BTCl a partir de extrato bruto protéico de sementes de *Vigna unguiculata* por meio de cromatografia de troca iônica em coluna de deae – celulose. A inserção corresponde ao perfil da recromatografia das frações indicadas em verde. O tracejado vermelho indica as frações coletadas contendo o BTCl puro, indicado pelo espectro de massa apresentado na figura 2.....**30**
- FIGURA 2.** Espectro de MALDI/TOF-MS do BTCl. Os três picos correspondem, respectivamente, ao BTCl duplamente carregado (m/z 4551), BTCl puro (m/z 9109) e BTCl na forma de dímero (m/z de 18185).....**31**
- FIGURA 3. A)** Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão das partículas de maghemita recobertas por dextrana. **B)** Histograma do diâmetro médio (D_m) das nanopartículas magnéticas de MagDex de 7,10 nm com desvio padrão (σ) do diâmetro médio de 0,26.....**33**
- FIGURA 4.** Micrografias Eletrônicas de varredura de MagDex, fluido magnético composto por maghemita recobertas por polímeros de dextrana, na presença (a) e na ausência (b) da proteína BTCl 50000(X). Setas indicam agregados de nanopartículas magnéticas.....**35**
- FIGURA 5.** Distribuição percentual do número de partículas e diâmetro hidrodinâmico de BTCl (0,5 mg/ml) na presença ou não de MagDex em diferentes pH: a) 4,0; b) 7,4; c)10,0. A linha preta corresponde ao BTCl. A linha azul ao complexo BTCl-MagDex e a linha vermelha a MagDex.....**39**
- FIGURA 6.** Efeito da variação de pH e temperatura no espectro de emissão do BTCl. em azul: espectro obtido em tampão carbonato 10mm (pH 10); em vermelho, espectro obtido em tampão PBS pH (7,4); em preto, espectro obtido em tampão acetato pH 4,0. a curva na coloração marron representa o estado de saturação em todos os pH e temperaturas após a adição de MagDex 0,62 mm. a linha cheia corresponde aos espectros de emissão obtidos à temperatura de 20 °C, enquanto os espectro pontilhados correspondem à temperatura de 45 °C.....**42**
- FIGURA 7.** Supressão de fluorescência do espectro de emissão do BTCl por meio da titulação com MagDex. O ensaio foi realizado em diferentes pH (NaCl 0,15m) a 20 °C. As concentrações de MagDex variaram de a = [0,0] a m = [0,62] mm, considerando-se a concentração de maghemita, de acordo com a seta.....**44**
- FIGURA 8.** Duplo logaritmo da fluorescência do BTCl suprimida com a titulação de *MagDex* (20 °C). Em diferentes pH; NaCl 0,15M.....**46**

FIGURA 9. Aproximação de van't Hoff para a formação do complexo BTCl-MagDex em diferentes pH. Por meio dessa relação foram calculados a variação de entalpia (ΔH) e de entropia (ΔS). O índice de correlação para os pH 4,0 e 7,4 foi de 0,94. No pH 10,0 o índice foi de 0,99.....**53**

FIGURA 10. A) Espectros de dicroísmo circular distante da região do UV (190-260 nm) em tampão PBS, pH 7,4 a 20°C do BTCl livre (Preto) e associado com MagDex (Vermelho). B) A tabela inserida mostra a percentagem das estruturas secundárias calculadas a 25 °C.....**57**

FIGURA 11. Atividade inibitória de BTCl livre (preto) e BTCl-MagDex (vermelho). A) Atividade residual da tripsina. B) Atividade residual da quimotripsina.....**60**

FIGURA 12. Sedimentação magnética do complexo BTCl-MagDex. a) BTCl-MagDex colocado no tempo zero no sistema de separação magnética; b) Após 48hs, as nanopartículas contendo BTCl-MagDex atraídas magneticamente para o fundo dos tubos (marrom escuro) e sobrenadante contendo BTCl e nanopartículas que não respondem ao campo (marrom claro).....**62**

FIGURA 13. Gráfico da Birrefringência Magnética Estática em função do campo magnético externo aplicado para MagDex (A) e BTCl-MagDex (B) na diluição (1:2). A linha sólida preta é o ajuste aos dados do sinal luminoso (I) normalizado, correspondente a soma das contribuições do sinal de birrefringência dos agregados (linha vermelha-(y)) e nanopartículas magnéticas isoladas (linha azul-(p)).....**64**

FIGURA 14. Gráficos da Birrefringência Magnética Estática em função dos valores de campo magnético externo das curvas de susceptibilidade das amostras de MagDex (\square) e BTCl-MagDex (\blacksquare). Nas diluições: A) 1:2; B) 1:4 e C) 1:8.....**67**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Diâmetro Hidrodinâmico (Dh) e PDI (índice de polidispersividade) para as amostras de BTCl, MagDex e o complexo BTCl-MagDex, obtidos por espalhamento de luz dinâmico.....**38**
- Tabela 2.** Valores das constantes de associação (Ka) do complexo BTCl-MagDex e número de sítios de ligação (n). O ensaio foi realizado em diferentes temperaturas e valores de pH.....**49**
- Tabela 3.** Potencial Zeta obtidos por espalhamento dinâmico da Luz ζ em diferentes valores de pH.....**51**
- Tabela 4.** Parâmetros termodinâmicos determinados para a formação do complexo entre o BTCl e MagDex. Os Valores de entalpia (ΔH_{vh}), entropia ΔS e energia livre de Gibbs a 25 °C nos diferentes pH, estão apresentados.**55**
- Tabela 5.** Percentual das contribuições de partículas magnéticas no sinal de luz da birrefringência magnética estática. Os valores de Hma representam o campo aplicado que gera a maior susceptibilidade magnética das amostras.....**65**

LISTA DE SIGLAS

- ΔG – Variação da energia livre de Gibbs
- ΔH – Variação de entalpia
- ΔS – Variação de entropia
- BAPNA – N –Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
- BBI – Inibidor do tipo Bowman-Birk extraído de grãos de soja
- BTCI – Inibidor de tripsina e quimotripsina extraído de *Vigna unguiculata*
- DC – Dicroísmo Circular
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- ELD – Espalhamento de Luz Dinâmica
- FFMS – Fluoreto de fenil metil-sulfonila
- GAPNA – N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida
- Hma – Campo onde a curva de susceptibilidade magnética rotatória é máxima;
- K – Kelvins (unidade de temperatura);
- Ln – Logaritmo natural;
- MagDex – Nanopartícula Maghemita recoberta por dextrana;
- MALDI-TOF - Matrix-assisted laser desorption/ionization;
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- Oe – Oersted (unidade de campo magnético);
- PBS – Tampão de fosfato de sódio
- pI- Ponto isoelétrico;
- PLGA – Poli lático-glicólico;
- R – Constante dos gases universal;
- u.a – Unidade arbitrária;
- λ – Lâmbida (comprimento de onda)
- $\lambda_{\text{máx}}$ – Valor máximo para λ ;

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1) NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: ALTERNATIVA PARA A TERAPIA DO CÂNCER.....	1
1.2) POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DE SERINOPROTEASES DO TIPO BOWMAN-BIRK.....	6
1.3) INIBIDORES DE SERINOPROTEASES BOWMAN-BIRK - ESTRUTURA E MECANISMO DE INIBIÇÃO.....	7
1.4) BTCl: INIBIDOR DE SERINOPROTEASE DE <i>VIGNA UNGUICULATA</i> (FEIJÃO COWPEA).....	8
2. JUSTIFICATIVA	12
3.1) OBJETIVO GERAL:.....	14
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	14
4) MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1) CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DOS COMPONENTES DA ASSOCIAÇÃO BTCl-MAGDEX.....	15
4.1.1) Plantio das sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	15
4.1.2) Obtenção do Extrato Bruto de <i>Vigna unguiculata</i>	15
4.1.3) Purificação do BTCl	16
4.1.4) Análise da pureza do BTCl.....	17
4.1.5) Quantificação de BTCl.....	18
4.1.6) Características do fluido magnético à base de maghemita recobertos com dextrana.....	18
4.1.7) Preparação do complexo BTCl-MagDex	19
4.1.8) Análise da ultraestrutura de MagDex e BTCl-MagDex.....	19
4.1.9) Análise da carga residual superficial e diâmetro hidrodinâmico das amostras coloidais de BTCl, MagDex e BTCl-MagDex	21
4.2) ESTUDO DA INTERAÇÃO DE BTCl AO FLUIDO MAGNÉTICO.	22
4.2.1) Avaliação da interação de BTCl e MagDex por supressão de fluorescência	22
4.3) AVALIAÇÃO DAS MUDANÇAS DAS CARACTERÍSTICAS ORIGINAIS DOS COMPONENTES DO COMPLEXO BTCl-MAGDEX.....	24
4.3.1) Análise estrutural do BTCl associado a MagDex por dicróismo circular (DC).....	24
4.3.2) Atividade inibitória de BTCl associado ou não a MagDex contra α -quimotripsina	25

4.3.3) Atividade inibitória de BTCi associado ou não a MagDex contra tripsina	26
4.3.4) Avaliação das características magnéticas de MagDex e BTCi-MagDex por birrefringência magnética estática	27
4.4) ASSOCIAÇÃO DE AMOSTRAS DE BTCi - MAGDEX, SEPARAÇÃO MAGNÉTICA E TAXA DE ASSOCIAÇÃO.....	28
4.5) ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5.RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1)OBTENÇÃO DO BTCi E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MAGDEX E BTCi-MAGDEX.....	30
5.1.1) Purificação e avaliação da pureza do BTCi	30
5.1.2) Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de MagDex	31
5.1.3) Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de BTCi e do complexo BTCi-MagDex.....	34
5.1.4) Avaliação do diâmetro hidrodinâmico da suspensão de BTCi associado ou não a MagDex	36
5.2) ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO BTCi COM MAGDEX	40
5.2.1) Supressão de fluorescência intrínseca do BTCi sob influência do pH e temperatura	41
5.2.2) Constantes de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n) do complexo BTCi – MagDex	43
5.2.3) parâmetros termodinâmicos da associação entre btc i e magdex.....	51
5.3) ALTERAÇÕES DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS DO BTCi QUANDO ASSOCIADO A MAGDEX.....	56
5.3.1) Conteúdo de estrutura secundária do BTCi associado à MagDex	56
5.3.2) Atividade inibitória de BTCi associado ou não a MagDex	57
5.3.2) Avaliação das características magnéticas de MagDex e BTCi-MagDex e da sedimentação magnética desse sistema.....	61
5.3.3) Avaliação das características magnétopticas de MagDex e BTCi-MagDex e da separação magnética desse sistema	62
6.CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1.INTRODUÇÃO

1.1) NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: ALTERNATIVA PARA A TERAPIA DO CÂNCER

O tratamento do câncer pode envolver intervenções locais ou sistêmicas. A cirurgia e a radioterapia podem ser consideradas como formas de tratamento local e que visam à remoção ou à destruição do tumor em uma determinada área do corpo. A quimioterapia e a hormonioterapia são técnicas utilizadas para combater a doença de forma sistêmica, buscando controlar ou destruir o câncer na extensão de todo o organismo (KALOGERAKOS et al., 2008).

Estas terapias tem sido adotadas há vários anos e, embora tenham inúmeros sucessos, podem ser consideradas danosas por atingirem tecidos saudáveis e por apresentarem efeitos colaterais severos, como náusea, vômito, perda de cabelo, fadiga, anemia, sangramento anormal, toxicidade em órgãos (WOOD, 2001). Outra dificuldade enfrentada na terapia contra o câncer é a falta de especificidade dos quimioterápicos e efeitos adversos crônicos.

A tentativa de se reduzir os problemas gerados pelos quimioterápicos levou à procura de alternativas que melhorem os aspectos farmacocinéticos de moléculas já conhecidas. Existe uma variedade de sistemas de entrega de drogas já em uso ou em fase de teste para a terapia contra o câncer. Essas são formulações baseadas em polímeros e lipossomos que permitem a associação de mais de uma molécula, melhorando as características farmacocinéticas, aumentando o tempo de vida de um composto na circulação sanguínea e o controle da liberação do fármaco (MOSES et al., 2003).

Uma das tecnologias que mais contribuiu no sentido do direcionamento específico de drogas e melhoria das propriedades farmacocinéticas tem sido a nanotecnologia. Definida por ser a aplicação da ciência que trabalha com materiais que apresentem um de seus componentes principais na escala de 1 a 100 nm, essa tecnologia merece atenção especial por evidenciar propriedades físicas e químicas dos materiais, as quais surgem somente quando nesta dimensão nanométrica. A nanotecnologia é uma tecnologia por definição multidisciplinar com a participação de vários domínios do conhecimento, como a química, biologia, física, medicina e engenharias (DAVIS, 2008).

Na área biomédica, a aplicação dessa técnica abre várias alternativas, principalmente para a terapia contra o câncer, por possibilitar a montagem de nanopartículas com plataformas multifuncionais. Essas nanopartículas podem ser constituídas por diferentes materiais (metais, polímeros, sílica), sendo possível aproveitar a extensa área de superfície para associar quimioterápicos com diferentes alvos moleculares (ex: proapoptótico, antiangiogênico etc.), agentes de contraste de imagens, e anticorpos monoclonais, entre outras moléculas (FERRARI, 2005).

Dentre estas diferentes composições de nanopartículas, uma que apresenta propriedades físico-químicas notáveis para aplicação biomédica são as composições de fluidos magnéticos. Estes são definidos por serem dispersões coloidais estáveis de nanopartículas magnéticas (NPM) em um meio dispersante. A estrutura de NPM é basicamente constituída por um núcleo magnético de óxido de metal, por exemplo, maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou magnetita (Fe_3O_4), uma camada molecular estabilizante adsorvida na superfície, e um solvente polar ou apolar. Variações nestes três componentes resultam em comportamentos diferentes destes fluidos magnéticos em

relação à nanotoxicidade, biodistribuição e estabilidade (LACAVA et al., 1999; GARCIA et al., 2005; SADEGHIANI et al., 2005).

Uma das características mais interessante destes fluidos é a propriedade superparamagnética, o que significa que apresenta magnetismo efetivo somente na presença de um campo magnético externo, o qual organiza os momentos magnéticos das partículas. No entanto, este fluido não retém esta magnetização após a retirada do campo (FIGUEIREDO, 2009). Essa característica é importante para aplicações diversas, tais como: refrigeradores, separação magnética de células (GUPTA, 2005), sistemas de entrega de drogas por direcionamento magnético (ALEXIOU et al., 2000; CHERTOK et al., 2010) e contraste em imagens de ressonância magnética (SANTANA et al., 2005).

Outra aplicação do superparamagnetismo destas dispersões coloidais é a magnetohipertermia, ou seja, o aquecimento do tecido tumoral ao se aplicar um campo magnético externo alternado sobre as NPM acumuladas no tumor (JORDAN et al., 2001). A indução do aumento da temperatura no local do tecido neoplásico é uma das formas mais antigas de tratamento antitumoral, tendo registros de sua utilização na Grécia, Roma e Egito no tratamento de tumores de mama. Antigamente o aumento da temperatura corporal era realizado por meio de banhos quentes ou com pedras (BARONZIO, 2006). Com a utilização dos fluidos magnéticos, o aquecimento tecidual pode acontecer de forma mais eficaz e localizada, o que abre uma nova oportunidade da aplicação da magnetohipertermia (GUEDES et al, 2005). Estudos utilizando fluidos magnéticos demonstram que as propriedades físicas das nanopartículas para a liberação de calor são mais eficientes do que micropartículas de metais (JORDAN et al.; STORM et al., 1982; JORDAN et al., 1999).

Além de a hipertermia apresentar características antitumorais próprias, como o aumento da permeabilidade de membranas, desestabilização de enzimas e do citoesqueleto, esta terapia é conhecida por ser uma modalidade complementar às terapias convencionais, como a radioterapia e quimioterapia. Células que atingem temperaturas próximas a 43°C apresentam maior sensibilidade à radiação e aos quimioterápicos (WUST et al., 2002).

Outra aplicação dos fluidos magnéticos é como agente de contraste de imagem para diagnóstico por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Estes fluidos superparamagnéticos melhoram o contraste nas imagens obtidas por RMN (GUPTA, 2005). Devido a isto, estes óxidos de ferro ultra-pequenos, como é o caso do Ferumoxtran-10, são aplicados para a visualização de lesões tumorais nos linfonodos (SAOKAR et al., 2010) e para a detecção de micrometastases (PAVON, 2007).

Os fluidos magnéticos apresentam um grande potencial de aplicação biomédica, mas para isso devem ser biocompatíveis, apresentar baixa toxicidade, e induzir o mínimo de danos às células normais. Para tanto, as nanopartículas devem ser recobertas com material biologicamente ativo. Seus parâmetros físicos, como o tamanho da partícula e as propriedades magnéticas da suspensão, devem ser investigados para se avaliar a biocompatibilidade e se sua aplicação é viável.

Esses fluidos magnéticos também são explorados para a imobilização de substâncias bioativas como enzimas, proteínas, anticorpos, agentes anticarcinogênicos. Essa associação em nanopartículas magnéticas pode ser alcançada por meio da associação com polímeros e por ligações covalentes com agentes e ligação como a carbodiimida, mas por vezes isso pode gerar a perda

da atividade da substância, principalmente das proteínas (LIAO, 2001). Outra forma de associação é a adsorção por meio de interações não covalentes entre a molécula e a superfície da nanopartícula magnética. Essa forma pode gerar menores alterações na estrutura e atividade da molécula estudada ().

No presente estudo, a formulação investigada foi de nanopartículas de maghemita recobertas com polímeros de dextrana. Esta formulação de nanopartículas já foi investigada em outros trabalhos onde foi avaliada a sua biocompatibilidade em estudos *in vitro* (BAUTISTA *et al*, 2005; PREDOI *et al.*, 2010). Maghemita é a forma oxidada da magnetita, e por isso considerada mais estável e menos susceptível a gerar espécies reativas de oxigênio. Os polímeros de dextrana são formados por moléculas de anidroglicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1-6)$ e ramificações do tipo 1, 3 (BAUTISTA *et al.*, 2005). Esse coloide é hidrofílico, solúvel em água, inerte em sistemas biológicos e não afeta a viabilidade celular. Estudos mostram que formulações de nanopartículas recobertas por dextrana aumentam a interiorização por células cancerígenas (KUMARI *et al.*, 2010). Outra característica positiva deste polímero é a redução da ativação do sistema complemento e a interação com macrófagos, o que aumenta o tempo de circulação de nanopartículas que apresentam dextrana (PASSIRANI *et al.*, 1998).

Em síntese, os fluidos magnéticos despertam interesse como veículo para a vetorização de quimioterápicos a sítios específicos, por possibilitar a magnetohipertermia, ou ser um agente de contraste de imagem e ainda permitir a melhora das propriedades farmacocinéticas de moléculas.

1.2) POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DE SERINOPROTEASES DO TIPO BOWMAN-BIRK

Embora várias drogas utilizadas no tratamento contra o câncer apresentem importância para os pacientes, a cura destas doenças ainda é alvo de várias pesquisas que visam a busca por novas moléculas de efeitos adversos mínimos ou ausentes. Por meio de novas descobertas da biologia do câncer, nota-se que a complexidade e a heterogeneidade são pontos marcantes desta patologia. Na maioria das vezes as drogas conhecidas falham por apresentarem um único alvo terapêutico, o que desconsidera a heterogeneidade do câncer e as múltiplas etapas da tumorigênese. As consequências disso são terapias sem melhoria efetiva na sobrevivência dos pacientes e o desenvolvimento da resistência aos quimioterápicos (ROTHENBERG et al., 2003).

Dentro deste cenário, uma classe de moléculas que desperta interesse por não apresentar somente um alvo molecular e ter atividade nas diferentes etapas da carcinogênese, são os inibidores de proteases. Os primeiros indícios da atividade anticarcinogênica dessas moléculas foram baseados em estudos epidemiológicos que evidenciaram uma baixa incidência de câncer em países que apresentavam uma dieta rica em leguminosas, como a soja, uma rica fonte de inibidores de proteases que são resistentes ao cozimento e à digestão no trato digestivo (YAVELOW et al., 1983). Estudos com esses inibidores de proteases mostraram a sua atividade anticarcinogênica contra linhagens celulares de diferentes tipos celulares e também a sua atividade preventiva contra fatores carcinogênicos físicos e químicos (YAVELOW et al., 1983; YAVELOW et al., 1985; KENNEDY, 1998).

A atividade anticarcinogênica desses inibidores está relacionada com o papel central das suas proteases alvos em todos os estágios da progressão tumoral. As proteases podem funcionar como moléculas sinalizadoras em vários processos que são essenciais para a progressão do câncer. Estas vias reguladas pelas proteases incluem proliferação, adesão, migração, diferenciação, invasão de tecidos (BERGERS et al., 2000) e angiogênese (NOËL et al., 1997; LÓPEZ-OTÍN, 2007).

1.3) INIBIDORES DE SERINOPROTEASES BOWMAN-BIRK - ESTRUTURA E MECANISMO DE INIBIÇÃO

Entre os inibidores de proteases, a classe melhor estudada é aquela representada pelos membros da família Bowman-Birk, primeiramente purificada de grãos de soja (*Glycine max*). Conhecido como o BBI clássico, esse inibidor foi primeiramente isolado por Bowman (1946) e posteriormente caracterizado por Birk et al (BIRK et al., 1963).

Estas proteínas pertencem a uma família de inibidores de baixa massa molecular entre 6 e 15 kDa e de estruturas estabilizadas por um alto conteúdo de ligações dissulfeto (5 a 7). Geralmente apresentam dois domínios inibitórios independentes para tripsina e quimiotripsina, mas também inibem outras moléculas. São designados como inibidores de serinoproteases por impedir a ação de proteases que utilizam o resíduo de serina como nucleófilo da reação de hidrólise da ligação peptídica, como é o caso das proteases quimiotripsina e tripsina (LASKOWSKI, 1980).

Estes inibidores normalmente se ligam às enzimas alvo por meio de uma alça de ligação complementar à estrutura do sítio ativo da protease. Esta alça de ligação exibe uma conformação protuberante em relação à parte central da proteína e é o

motivo de reconhecimento do sítio catalítico da enzima. Na secção central desta alça se encontra exposta ao solvente a ligação peptídica P1-P1', conhecida como sítio de reação que pode ser clivado pela serinoprotease (LASKOWSKI, 1980). Os parâmetros da cinética de reação desta hidrólise mostram que estes inibidores atuam como substratos para as serinoproteases, sendo, portanto, inibidores competitivos para essas enzimas. Considerando-se que a maioria dos inibidores Bowman-Birk apresentam os sítios reativos localizados em subdomínios distintos na molécula, os inibidores podem formar complexos binários e ternários com suas enzimas alvos.

As características estruturais como o alto conteúdo de ligações dissulfeto das proteínas desta família de inibidores conferem estabilidade, proporcionando-lhes resistência à desnaturação térmica/química e manutenção de sua atividade inibitória em pH extremos e temperaturas altas (LASKOWSKI, 1980; OTLEWSKI et al., 1999; SILVA, 2003).

1.4) BTCl: INIBIDOR DE SERINOPROTEASE DE *VIGNA UNGUICULATA* (FEIJÃO COWPEA)

No ano de 1966, Ventura e Xavier-Filho purificaram um inibidor de serinoproteases de sementes de *Vigna Unguiculata* (feijão-de-corda), da variedade Seridó. Este inibidor foi denominado de BTCl (Black-eyed pea trypsin chymotrypsin inhibitor) (VENTURA, 1966) e a partir de então, vários trabalhos foram realizados para a caracterização biofísica e bioquímica desta proteína (FACHETTI et al., 1984; MORHY, 1987; FREITAS et al., 1999).

Como outras proteínas da família Bowman-Birk, o BTCl é uma molécula de baixa massa molecular (~ 9 kDa) com uma cadeia polipeptídica de 83 resíduos de

aminoácidos, 7 ligações dissulfeto e dois sítios reativos independentes para quimotripsina e tripsina (MORHY, 1987). Apresenta alta estabilidade estrutural e funcional, mantendo a sua atividade inibitória a 25°C em valores de pH de 3 a 11. Após 60 minutos de aquecimento a 95°C, esta macromolécula mantém aproximadamente 100% da sua atividade inibitória (SILVA et al., 2001).

Após a caracterização físico-química e estrutural iniciou-se estudos visando investigar o potencial biotecnológico desta molécula em diferentes áreas. Sendo que no ano de 2003 Franco e colaboradores demonstraram o efeito inibitório do BTCI contra serinoproteases de larvas de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), conhecido como a praga das plantações de algodão (*Gossypium hirsutum* L) (FRANCO et al., 2003). Nesse estudo foi demonstrado o efeito pesticida deste inibidor tendo sido responsável por mortalidade de 65% das larvas deste coleóptero.

Carvalho e colaboradores (CARVALHO et al., 2008) investigaram o efeito natriurético do BTCI. Esse estudo demonstrou o efeito protetor do BTCI na degradação do peptídeo natriurético guanilina por serinoproteases, além de promover, de forma isolada, o aumento da filtração glomerular.

Recentemente, o BTCI foi caracterizado como potente agente anticarcinogênico com atividade citotóxica e citostática em células de câncer de mama da linhagem MCF-7 (JOANITTI et al., 2010). Nesse estudo foi demonstrado que células tumorais tratadas com BTCI 200 µM entravam em morte celular programada e apresentavam alterações como: desestabilização da cromatina, redução do potencial de membrana mitocondrial e da viabilidade e proliferação celular; aumento da fragmentação de DNA; condensação de cromatina; e alterações

do ciclo celular, integridade da membrana plasmática e morfologia das células, sem apresentar efeitos similares em células normais.

O estudo sobre um possível alvo molecular responsável pela atividade anticarcinogênica deste inibidor demonstrou a sua atividade anti-quimotríptica da subunidade do proteassoma 20S (SOUZA, 2010). O sistema de degradação de proteínas celulares reguladas pelo sistema ubiquitina-proteassoma é fundamental para a manutenção e regulação do ciclo celular. A inibição dessa atividade quimotríptica do proteassoma causa redução da degradação de proteínas em células tumorais, levando as a apoptose (CHEN et al., 2005).

A partir destes dados experimentais novas possibilidades se abriram para a melhoria da terapia contra o câncer utilizando essa molécula. Recentemente dois trabalhos sobre a nanoestruturação deste inibidor em diferentes formulações foram iniciados para aplicação biotecnológica visando, em projetos futuros, a terapia contra o câncer. Oliveira em 2012 sintetizou e caracterizou fisicoquimicamente nanopartículas de polímeros de quitosana contendo o BTCl (Oliveira, 2012). Nesse estudo a eficiência de encapsulamento foi superior a 50% e o BTCl foi liberado de forma prolongada em condições fisiológicas, mantendo a sua atividade inibitória contra as proteases cognatas. Joanitti em 2012 desenvolveu formulações de lipossomos contendo o inibidor de serinoproteases BTCl para otimizar a entrega da molécula e a atividade anticarcinogênica desse sistema em células de câncer de mama da linhagem MCF-7.

Nesse sentido, pretende-se, nesse projeto, investigar as propriedades inibitórias dessa molécula associado com fluido magnético. Para isso, o objetivo do projeto ora apresentado é a produção e caracterização biofísica e estrutural de fluido

magnético constituído de nanopartículas de maghemita associadas ao BTCl, visando a otimização da distribuição e ação específica desse inibidor em tecidos tumorais, em projetos futuros.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença de impacto mundial que, no ano de 2011, acometeu 13 milhões de pessoas, levando a óbito outras 8 milhões. Na maioria das vezes, as pessoas que sofrem desta doença passam por tratamentos que geram efeitos colaterais severos além da diminuição da qualidade de vida. Apesar dos esforços para a melhoria da terapia contra o câncer ainda existem dificuldades nessa área o que demonstra a complexidade da doença. A pesquisa busca novas moléculas e indica caminhos para melhorar os tratamentos atuais. Neste contexto, tem se estudado o uso dos inibidores de serinoproteases da classe Bowman-Birk, moléculas que atuam como agentes anticarcinogênicos em diferentes etapas da progressão tumoral, o que é um ponto positivo na busca por alternativas no tratamento dessa doença de características heterogêneas e complexas.

O BTCI (Black eyed-pea Trypsin chymotrypsin inhibitor) está nesta classe de inibidores, já com a sua atividade anticarcinogênica estudada, além de apresentar atividade citotóxica induzindo as células tumorais à apoptose com graves alterações morfológicas e promovendo a permeabilização da membrana dos lisossomos, efeito ainda não demonstrado nos estudos com o BBI clássico. Considerando esse potencial farmacológico do BTCI, bem como os benefícios da utilização de fluidos magnéticos na vetorização de drogas, foram definidos nessa dissertação objetivos específicos visando associar o BTCI com nanopartículas magnéticas. Espera-se que o complexo assim formado e biofisicamente caracterizado, possibilite a magnetovetorização para sítios específicos de tumores conhecidos, associando a magnetohipertermia, a qual já é utilizada como tratamento complementar à quimioterapia e radioterapia. Isso pode resultar na ação sinérgica e potencializada

desse inibidor e também na diminuição das concentrações necessárias para a terapia em comparação com as utilizadas atualmente.

A partir do exposto acima, neste projeto, pretende-se associar o BTCl com um fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas com dextrana, investigando as suas características biofísicas e estruturais da associação e características magnéticas.

3) OBJETIVOS

3.1) OBJETIVO GERAL:

Caracterizar biofísica e estruturalmente o complexo formado por nanopartículas constituídas de maghemita recobertas com dextrana (MagDex) e o inibidor de serinoprotease BTCI e avaliar a atividade inibitória, estrutura e estabilidade do BTCI nesse complexo.

3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- A. Analisar morfologicamente o BTCI associado com nanopartículas MagDex por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), e varredura (MEV) e Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL);
- B. Determinar a constante de ligação entre o BTCI e MagDex e os parâmetros termodinâmicos dessa ligação em diferentes condições, utilizando a técnica de supressão de fluorescência;
- C. Avaliar a estabilidade do complexo BTCI-MagDex por meio da avaliação do potencial zeta;
- D. Avaliar possíveis mudanças no conteúdo total de estrutura secundária do BTCI associado à MagDex por dicroísmo circular;
- E. Comparar a atividade inibitória do BTCI livre e complexado com MagDex;
- F. Avaliar a taxa de associação de BTCI com MagDex e separar magneticamente o complexo BTCI-MagDex que respondem ao campo magnético;
- G. Caracterizar magneto-opticamente MagDex e BTCI-MagDex, por meio da técnica de birrefringência magnética estática.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DOS COMPONENTES DA ASSOCIAÇÃO BTCI-MAGDEX

4.1.1) Plantio das sementes de *Vigna unguiculata*

Sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (variedade Seridó), inicialmente obtidas do banco de sementes do Departamento de Bioquímica da Universidade de Fortaleza, foram plantadas na Estação Biológica da Universidade de Brasília (UnB). Por volta de três meses após o plantio, as vagens maduras foram colhidas, secas à temperatura ambiente por um dia, para em seguida serem debulhadas. Os grãos obtidos foram utilizados para extração da proteína BTCI.

4.1.2) Obtenção do extrato bruto de *Vigna unguiculata*

A extração e purificação do BTCI a partir de sementes de *Vigna unguiculata* foram realizadas baseadas na metodologia previamente descrita (VENTURA *et al.*, 1966). Quinhentos gramas de sementes de *Vigna unguiculata* trituradas foram ressuspensos em 2 litros de água destilada contendo 200 µL do inibidor de protease fluoreto de fenil metil-sulfonila (FFMS) (100 mM). Esta suspensão foi mantida sob agitação magnética por 14 horas a 4°C e, em seguida, homogeneizada por 15 minutos em liquidificador industrial e filtrada em tecido de algodão. Após a adição de 500 mL de água destilada, a polpa de feijão retida no tecido foi homogeneizada e filtrada novamente.

A fração líquida obtida foi centrifugada a 8000 *g* por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido à precipitação com ácido tricloroacético (TCA), sob agitação magnética constante, até a concentração final de 2,5% (v/v). Em seguida, este material foi filtrado em papel filtro e a fração líquida foi submetida à precipitação

com sulfato de amônio (p/v) até a saturação final de 50%. Essa suspensão foi centrifugada a 8000 g a 4°C por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi ressuspenso com 40 mL de água destilada, dialisado contra água destilada, congelado e liofilizado, consistindo do extrato bruto proteico dessas sementes. Após a liofilização das amostras de BTCl foram pesadas e foi obtido um rendimento de cerca de 40 mg de proteína partir dos 500 g de sementes trituradas de *Vigna unguiculata*.

4.1.3) Purificação do BTCl

O BTCl foi purificado por cromatografia líquida de troca iônica utilizando a resina DEAE-celulose. Trezentos miligramas de extrato bruto foram dissolvidos em 15 mL de tampão fosfato (10 mM) e centrifugados a 8000 g por 10 minutos para retirar o material não solubilizado. A coluna de DEAE-celulose (3 cm (diâmetro) X 14 cm (altura)) foi previamente ativada com lavagens sucessivas de: 150 mL de HCl 200 mM; 250 mL de água destilada; 150 mL de NaOH 200 mM; 250 mL de água destilada; seguida de 30 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,3) e 300 mL de tampão de equilíbrio (fosfato de potássio 10 mM, pH 7,3). Nesta etapa, a amostra de extrato bruto preparada foi aplicada por gravidade na coluna cromatográfica, seguida da adição de mais 150 mL de tampão de equilíbrio.

Para a eluição da proteína foi montado um gradiente de NaCl com duas soluções: solução (A), 500 mL de tampão fosfato 10 mM; solução (B) 500 mL de tampão fosfato 10 mM e NaCl 0,8 M. Neste sistema de soluções foi estabelecido um fluxo de 3,5 mL/min, utilizando uma bomba peristáltica acoplada à coluna cromatográfica. Os primeiros 190 mL do gradiente foram desprezados e a partir

deste volume as frações foram coletadas em 95 tubos de ensaio por um coletor automático (3 mL/tubo).

As frações proteicas foram monitoradas por leitura da absorbância a 280 nm no espectrofotômetro (Biochrom Libra S12, Reino Unido). As frações correspondentes ao BTCI foram identificadas por ensaio de atividade inibitória contra tripsina e comparativamente aos cromatogramas previamente reportados no trabalho de Ventura et al., 1966. As frações correspondentes ao BTCI foram separadas em duas partes, sendo a porção inicial das frações reservada para recromatografia e a parte descendente corresponde à amostra de BTCI purificada.

4.1.4) Análise da pureza do BTCI

A pureza das amostras do BTCI foi confirmada por meio da técnica de espectrometria de massa, com a colaboração do Dr. Luciano Paulino da Silva, pesquisador do Laboratório de Espectrometria de Massa (EMBRAPA – Cenargem). Uma alíquota dessa amostra liofilizada foi ressuspensa em 10 µL de água nanopura. Um microlitro dessa amostra foi adicionado em três microlitros de matriz de ácido α -cyano-4-hidroxi-cinâmico (5 mg ácido alfa-ciano hidroxicinâmico, 250 µL de acetonitrila, 200 µL de água e 50 µL de TFA a 3%). Em seguida, um microlitro desta suspensão foi distribuído em uma placa do tipo MTP AnchorChip var/384 (Bruker daltonics).

Após secagem completa da matriz a massa molecular do BTCI foi determinada utilizando o espectrômetro de massa MALDI/TOF em um equipamento Ultra Flex III (Bruker Daltonics- Alemanha), operado no modo linear positivo, no qual os íons são formados com a utilização de feixe de laser (Smart Beam) e acelerados

a 20 kV (frequência de 50 Hz). Os espectros obtidos foram analisados pelo programa FlexAnalysis 3 (Bruker Daltonics).

4.1.5) Quantificação de BTCI

A expressão apresentada abaixo (equação 01) foi utilizada para quantificar a concentração de BTCI, a ser utilizado nos experimentos descritos a seguir, considerando-se a absorbância da proteína em comprimento de onda de 280 nm.

$$\text{Concentração (mg/ml)} = \frac{A_{280} \times 10}{A^{1\%}_{280}} \quad (\text{equação 01})$$

A₂₈₀ = Absorbância da amostra no comprimento de onda de 280 nm.

A_{1% 280} = Absorbância da solução de 1% de BTCI no comprimento de onda de 280 nm, igual a 8,23

4.1.6) Características do fluido magnético à base de maghemita recobertos com dextrana

A amostra de fluido magnético utilizada neste trabalho foi sintetizada pela aluna de doutorado Kely Lopes Caiado do grupo coordenado pela professora Patrícia Pommé Confessori Sartoratto, da Universidade Federal de Goiás – Instituto de Química (UFG – IQ) – e gentilmente cedida para a sua aplicação neste projeto de pesquisa. A suspensão coloidal magnética é constituída por nanopartículas (NPs) de maghemita (γ -Fe₂O₃) recobertas por dextrana de 250 kDa, resultando em um fluido surfactado, denominado MagDex. Esta amostra apresenta $7,55 \times 10^{15}$ partículas/mL e concentração de maghemita de $1,84 \times 10^{-2}$ g/mL.

Resumidamente, a síntese do fluido foi realizada por meio do método da coprecipitação de sais de ferro na presença de dextrana de alta massa molecular (250 KDa). Após a precipitação de partículas com a adição de amônia (28 %) à solução de sais de ferro para uma concentração final de 5%, a amostra foi lavada com água destilada até que o sobrenadante atingisse pH 7,0. A mesma amostra foi submetida ao banho de ultrassom para a possível reorganização das cadeias de dextrana e estabilização da suspensão coloidal magnética. Para a separação das partículas não peptizadas foi realizada uma última centrifugação por 20 minutos a 3500 g. A amostra de MagDex correspondia ao sobrenadante desta centrifugação (Gunther, 1993).

4.1.7) Preparação do complexo BTCl-MagDex

O complexo BTCl-MagDex foi obtido por meio da adição de 100 µL BTCl, na concentração de 10 mg/mL, a 400 µL de MagDex $7,55 \times 10^{15}$ partículas/mL. Esta suspensão foi mantida sob agitação constante por 6 horas a temperatura ambiente. Este complexo foi utilizado nas análises de MEV e Birrefringência Magnética Estática.

4.1.8) Análise da ultraestrutura de MagDex e BTCl-MagDex

O valor do diâmetro de MagDex foi determinado por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. A cobertura de dextrana foi parcialmente removida por meio de lavagens de MagDex com n-pentano e seca em estufa a 40 °C para aumentar a nitidez e o contraste das micrografias obtidas e permitir a contagem e determinação do diâmetro da nanopartícula magnética.

Em seguida, a amostra foi diluída em um mL de água destilada na proporção de (1:1000) e sonicada por 20 minutos. Uma alíquota da amostra foi depositada em

tela de cobre de 300 malhas recoberta com polímero formvar (0,4%, diluído em clorofórmio) e secas a temperatura ambiente. As imagens foram obtidas no microscópio de transmissão marca Jeol, modelo JEM 1011 (Japão), do Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Ciências Biológicas.

As eletromicrografias foram registradas por meio do sistema de aquisição de imagens UltraScan – software Digital Micrograph 3.6.5 (GATAN-Estados Unidos). A partir da medida do diâmetro de 1000 nanopartículas utilizando o programa ImagePro Plus 5.1, os dados foram ajustados em uma distribuição de classe e o histograma do tamanho das nanopartículas foi determinado como foi revisto e descrito detalhadamente por Figueiredo (2009). A determinação do diâmetro médio de MagDex foi realizada com colaboração do aluno de doutorado Fernando Mendes Lucas de Oliveira, orientado pelo professor Dr. Kalil Skeff Neto.

Além disso, a caracterização da topologia das amostras de MagDex e BTCl-MagDex foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL JSM-7001F). Uma alíquota (3 μ L) de solução de ambas as amostras, MagDex e BTCl-MagDex diluídas (1:1000) foi depositada sobre um pequeno cilindro de níquel (*stub*), coberta com mica e deixada em temperatura ambiente para secagem durante a noite. Após a metalização com ouro, as amostras foram visualizadas na microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL JSM-7001F) e uso do software PC-SEM (Ver. 2.0.0.8.) Essas análises foram realizadas sob supervisão do mestrando Raphael Cândido Apolinário Peixoto sob orientação da Prof.^a Doutora Sônia Nair Bão.

4.1.9) Análise da carga residual superficial e diâmetro hidrodinâmico das amostras coloidais de BTCl, MagDex e BTCl-MagDex .

O diâmetro hidrodinâmico das amostras de MagDex e BTCl-MagDex foram analisadas por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL). Esta técnica baseia-se na relação da intensidade da luz dispersa por partículas ou macromoléculas em solução, ao longo do tempo, com o movimento Browniano das partículas em suspensão. A distribuição de tamanho gerada por meio desta técnica é dada de acordo com a intensidade de luz. Esta relação pode ser convertida em número de partículas distribuídas por tamanho, baseando-se na solução de Mie, que descreve por meio das equações de Maxwell a dispersão eletromagnética de partículas esféricas (SIU, 2002). Os gráficos de Número x Diâmetro (nm) foram considerados para a análise dos resultados de diâmetro hidrodinâmico das amostras estudadas nesse projeto (KASZUBA et al, 2007).

O EDL pode ser utilizado para a determinação do zeta potencial (ζ) de forma indireta. Esse é definido como o potencial elétrico da superfície de cisalhamento hidrodinâmico entre a camada de íons fortemente ligada à superfície da partícula (camada de Stern) e a camada mais externa (camada difusa), e o meio circundante. O potencial zeta é função da carga superficial da partícula, da camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda (DELGADO, 2007). Em todos os experimentos desenvolvidos nessa dissertação, para a determinação do potencial zeta, as amostras foram preparadas em acetato de sódio 10 mM, pH 4,0 ; PBS 1X, pH 7,0 e carbonato de sódio 10 mM pH 10,0.

O potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico foram medidos para as soluções de BTCl (0,5 mg/mL) , associado ou não a MagDex na concentração de 7,55 x

10¹⁴(diluído na proporção de 1:10). Para isso foi utilizado o equipamento Zetasizer, Malvern – nano SZ (laser 633 nm), operando com o ângulo de detecção de 173°. Este ângulo de detecção apresenta vantagens, como a utilização de amostras mais concentradas, como é o caso da suspensão magnética MagDex (KASZUBA et al., 2008). Os experimentos foram realizados em triplicata à temperatura de 25°C.

4.2) ESTUDO DA INTERAÇÃO DE BTCl AO FLUIDO MAGNÉTICO.

4.2.1) Avaliação da interação de BTCl e MagDex por supressão de fluorescência

O estudo de supressão da fluorescência intrínseca do BTCl, por titulação com MagDex, foi realizado utilizando-se o equipamento espectrofluorímetro JASCO – FP 6500, acoplado ao sistema de controle de temperatura Peltier – JASCO (ETC – 273T, Japão). Os parâmetros do equipamento utilizados para as análises foram: velocidade de escaneamento de 1000 nm/minuto, abertura dos *slits* de excitação e emissão de 5 nm, tempo de resposta de 0,2 segundos com fotomultiplicador operando em sensibilidade média. O único triptofano da cadeia polipeptídica do BTCl foi excitado a 295 nm e o espectro de emissão foi registrado entre os comprimentos de onda de 305 a 450 nm.

Os ensaios de fluorescência foram realizados com a solução de BTCl na concentração de 100 µM, em três condições diferentes: tampão PBS 1X (pH 7,4; NaCl 0,15 M); acetato de sódio 10 mM (pH 4,2; NaCl 0,15 M) e carbonato de sódio 10 mM (pH 10,2; NaCl 0,15 M). Os espectros de emissão das amostras em diferentes pHs foram registrados nas temperaturas de: 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. Em cada temperatura foram registradas as atenuações da fluorescência intrínseca

do BTCl, após a titulação com MagDex $1,36 \times 10^{-2}$ M, partindo de uma concentração de 0 M até $7,3 \times 10^{-4}$ M de maghemita.

Os ensaios de associação do BTCl com MagDex no pH fisiológico foram realizados nas temperaturas de 23, 25, 27, 30, 32, 34, 36, 38 e 40 °C (tabela 1). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As constantes de associação (Ka) do complexo BTCl–MagDex, nas diferentes temperaturas, foram calculadas a partir das curvas ajustadas que relacionam o $\log [(F_0 - F/F - F_\infty)]$ versus o logaritmo da molaridade de maghemita adicionada ($\log[MagDex]$) à solução de BTCl (equação 02). Nesse caso, F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência de $[MagDex]$ e F_∞ é a intensidade de fluorescência no estágio de saturação do sistema. A área sob a curva formada pelos espectros de emissão de fluorescência foi considerada como valor da intensidade (TEDESCO et al., 2003).

$$\log [(F_0 - F/F - F_\infty)] = n (\log[MagDex]) - \log (Kd) \quad (\text{equação 02})$$

A inclinação da reta do gráfico duplo-logaritmo, obtida com os dados experimentais acima citados, é equivalente ao número de sítios de ligação (n). O valor do logaritmo da constante de dissociação Kd foi determinado considerando-se o valor do logaritmo de $[MagDex]$ quando a reta cruza o eixo das abscissas. A constante de associação Ka foi obtida a partir da relação de reciprocidade entre a constante de dissociação e Ka .

A aproximação de van't Hoff descrita abaixo (equação 03) relaciona os valores do logaritmo natural de Ka e o inverso das temperaturas. Essa expressão foi considerada para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos, entalpia (ΔH), entropia

(ΔS) e energia livre de Gibbs a 25 °C (ΔG^{25}), resultantes da associação do BTCI com a MagDex, em três pHs diferentes (equações 03 e 04).

$$\ln Ka = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (\text{equação 03})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{equação 04})$$

4.3) AVALIAÇÃO DAS MUDANÇAS DAS CARACTERÍSTICAS ORIGINAIS DOS COMPONENTES DO COMPLEXO BTCI-MAGDEX

4.3.1) Análise estrutural do BTCI associado a MagDex por dicroísmo circular (DC)

Dicroísmo Circular é a medida da absorbância diferencial entre duas ondas eletromagnéticas circularmente polarizadas por amostras opticamente ativas. Esta técnica é utilizada na investigação estrutural de proteínas em solução, sob diferentes condições (temperatura e pH) e também permite avaliar o efeito de ligantes adicionados ao sistema sob análise (CORREA, 2008).

As estruturas secundárias de BTCI, livre e complexado com MagDex, foram comparadas por meio da técnica de dicroísmo circular, utilizando o espectropolarímetro (JASCO – 815, Japão) sob fluxo constante de nitrogênio, acoplado ao sistema de controle de temperatura Peltier – ETC – 273T (JASCO-Japão). Os parâmetros do equipamento foram: abertura dos slits de um nm, velocidade de escaneamento de 50 nm/min e tempo de resposta de 4 segundos. O tratamento dos dados foi realizado utilizando-se o programa Spectra Analysis.

Os espectros dicróicos foram obtidos na faixa de comprimento de onda longe da região do ultravioleta (190 – 250 nm) a 25 °C, região na qual predomina como cromóforo o grupo amida da ligação peptídica. A amostra de BTCl foi preparada em tampão PBS 0,1X (pH 7,4) na concentração de 0,075 mg/mL e analisada em cubeta de 1 mm. As mudanças conformacionais do BTCl foram analisadas na presença de MagDex na concentração de $6,36 \times 10^{12}$ partículas/mL.

O sinal dicróico que é a medida da elipticidade em mili graus (θ) foi convertido em elipticidade molar $[\theta]$ ($deg \times cm^2 \times dmol^{-1}$) de acordo com a expressão abaixo (equação 05), na qual C é a concentração da amostra em (mg/mL) e l , o caminho óptico percorrido pelas duas componentes circulares da luz. O valor de 112 foi considerado como a massa molecular do resíduo médio.

$$[\theta] = \frac{112 \times \theta}{10 \times C \times l(c)} \text{ grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1} \quad (\text{equação 05})$$

O valor do percentual do conteúdo de estruturas secundárias foi estimado pelo ajuste das curvas dicróicas no comprimento de onda de 250 a 190 nm, utilizando o programa “CD spectra deconvolution” (CDNN) versão 2.1 (bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/).

4.3.2) Atividade inibitória de BTCl associado ou não a MagDex contra α -quimotripsina

O ensaio colorimétrico da hidrólise do substrato sintético N-glutaryl-L-phenylalanin-p-nitroanilide (GPNA) pela α -quimotripsina foi utilizado para comparar as atividades inibitórias do BTCl livre e na presença de MagDex. As soluções foram preparadas em tampão de ensaio Tris-HCl 50 mM (CaCl₂ 20 mM, pH 7,6): enzima

α -quimotripsina (630 $\mu\text{g}/\text{mL}$); substrato GPNA (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e as soluções estoques das amostras de BTCl (80 μM), BTCl-MagDex (80 $\mu\text{M}/ 1,9 \times 10^{15}$ partículas/mL).

Quarenta microlitros da solução de BTCl associados ou não a MagDex foram incubados com 40 μL de α -quimotripsina por 15 minutos à temperatura ambiente, em placa de 96 poços. Em seguida, 200 μL do substrato GPNA foram adicionados ao sistema de reação. Após trinta minutos, a reação foi interrompida com a adição de 30 μL de ácido acético 30% (v/v).

A absorbância foi monitorada no comprimento de onda de 410 nm correspondente à faixa de absorção do produto p-nitroanilida formado a partir da hidrólise do substrato GPNA sob a ação da α -quimotripsina. Os ensaios foram realizados em triplicata e o controle positivo desta reação foi efetuado por meio da adição de 40 μL de água nanopura.

4.3.3) Atividade inibitória de BTCl associado ou não a MagDex contra tripsina

A atividade inibitória de BTCl livre contra tripsina e complexado a MagDex foi analisada a partir do ensaio enzimático com o substrato sintético desta endopeptidase (N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride – BAPNA). Todas as soluções foram preparadas em tampão de ensaio Tris-HCl 50 mM (CaCl₂ 20 mM, pH 8,2): tripsina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o substrato BAPNA (430 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e as soluções estoques das amostras de inibidores livres ou associados a BTCl (80 $\mu\text{L}/1,9 \times 10^{15}$ partículas/mL).

No ensaio à temperatura ambiente, quarenta microlitros das amostras foram incubados com o mesmo volume de tripsina por 15 minutos. Após este período, 200 μL do substrato BAPNA foram adicionados ao sistema de reação. Após trinta

minutos da adição do substrato, a reação foi interrompida pela diminuição do pH por meio da adição de 30 μL de ácido acético 30% (v/v). A absorbância foi monitorada para o comprimento de onda de 410 nm.

4.3.4) Avaliação das características magnéticas de MagDex e BTCI MagDex por Birrefringência Magnética Estática

As propriedades magnéticas e ópticas das amostras MagDex e BTCI-MagDex foram comparadas por birrefringência estática. Essa técnica é baseada no fato das nanopartículas magnéticas, por apresentarem momento magnético, se orientarem quando submetidas a um campo magnético externo. Quando o fluido magnético é exposto ao campo, as nanopartículas em movimentos aleatórios, estado opticamente isotrópico, se organizam mudando a orientação para um estado opticamente anisotrópico, gerando o sinal luminoso da birrefringência (FIGUEIREDO, 2008).

Esta técnica permite discriminar a presença de nanopartículas magnéticas isoladas e os agregados presentes nos fluidos magnéticos que estão interagindo magneticamente. Outro parâmetro que contribui para o sinal da birrefringência magnética estática é a susceptibilidade magnética dependente do campo. Por meio dessa técnica, o valor do campo onde esse parâmetro é máximo (H_{ma}) pode ser determinado (STEIN, 2010).

As medidas de birrefringência e análise da influência da diluição nas propriedades magnéticas de MagDex e BTCI – MagDex foram realizadas com as amostras preparadas nas diluições de (1:2), (1:4) e (1:8) depois de complexado. As medidas de birrefringência e análise dos dados foram realizadas em colaboração com o professor Dr. Kalil Skeff e seu aluno de mestrado Cléver Stein.

4.4) ASSOCIAÇÃO DE AMOSTRAS DE BTCI - MAGDEX, SEPARAÇÃO MAGNÉTICA E TAXA DE ASSOCIAÇÃO

O ensaio de associação do inibidor BTCI na superfície das nanopartículas magnéticas foi realizado por meio da adição de 100 µL BTCI (10 mg/mL) a 400 µL de MagDex $7,55 \times 10^{15}$ (partículas/mL). Esta suspensão foi mantida sob agitação constante por 6 horas a temperatura ambiente.

Em seguida, ímãs permanente de neodímio (NdFeB) foram utilizados para separar o BTCI associado com os NPM de maghemita, do BTCI livre. O gradiente de campo formado foi de 5 kgauss. Esse procedimento foi realizado a 4°C para potencializar a resposta magnética das nanopartículas por 48hs. Após este período, duas fases distintas da amostra de BTCI-MagDex foram observadas: o precipitado de partículas magnéticas e o sobrenadante de coloração com aspecto amarronzado. Esta parte superior foi cuidadosamente separada e depositada em tubos plásticos contendo filtros millipore (100 kDa), os quais foram centrifugados durante 20 minutos a 15000 *g* (4°C). A proteína contida na amostra e associada à partícula foi quantificada por meio da leitura da absorbância a 280nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. O cálculo de eficiência de associação foi feito de acordo com a expressão descrita abaixo (equação 06).

$$q = \left(1 - \frac{Cf}{Ci}\right) \times 100\% \quad (\text{equação 06})$$

Onde *q* corresponde a eficiência de associação de BTCI a MagDex, *Ci* e *Cf* correspondem, respectivamente, a concentração inicial de proteína adicionada a suspensão magnética e a concentração de proteína quantificada no sobrenadante em mg/mL.

4.5) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das triplicadas foram tratados por meio de análises estatísticas utilizando o erro padrão. Os índices de correlação das relações de linearidade foram obtidos considerando os erros padrões. Essas análises foram realizadas utilizando o programa OriginPro 8.

5.RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1)OBTENÇÃO DO BTCI E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MAGDEX E BTCI-MAGDEX

5.1.1) Purificação e avaliação da pureza do BTCI

Os perfis cromatográficos de amostras resultantes do extrato de sementes de *Vigna unguiculata*, eluidas da cromatografia e recromatografia de troca iônica, estão representados na figura 1. Os cromatogramas apresentaram o mesmo padrão

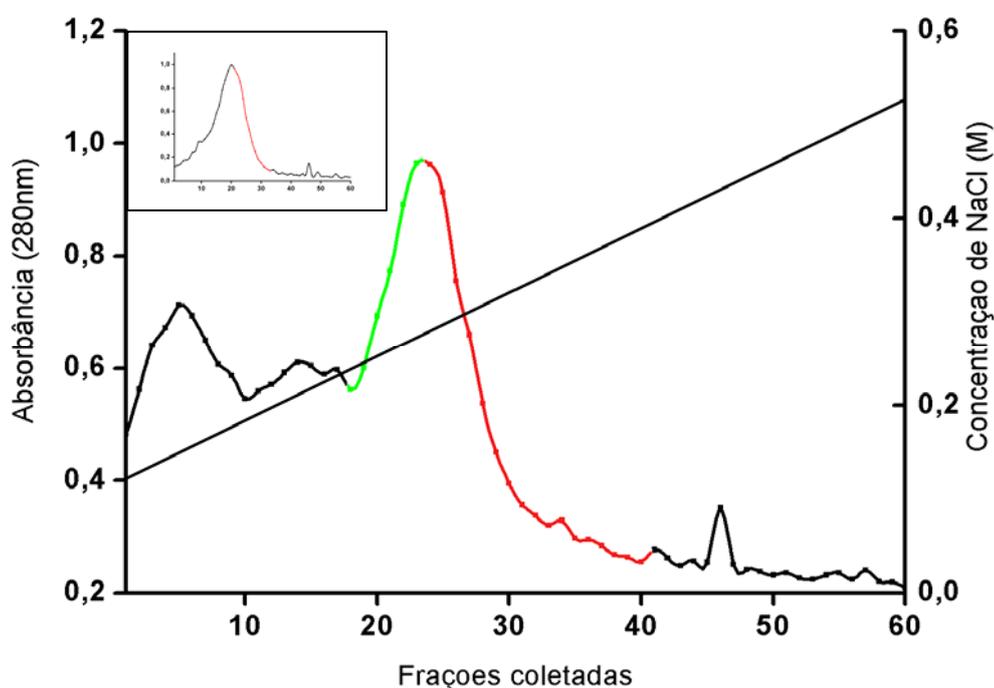


FIGURA 1. Perfil cromatográfico da purificação de BTCI a partir de extrato bruto proteico de sementes de *Vigna unguiculata* por meio de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE – celulose. A inserção corresponde ao perfil da recromatografia das frações indicadas em verde. O traçado vermelho indica as frações coletadas contendo o BTCI puro, indicado pelo espectro de massa apresentado na figura 2.

descrito em trabalhos anteriores (VENTURA et. al, 1966; JOANITTI, 2008), com eluição do BTCI puro na concentração de NaCl de aproximadamente 0,35 M, indicado pelas frações mostradas em vermelho.

Essas frações coletadas foram dialisadas, congeladas e liofilizadas para em seguida serem analisadas quanto ao grau de pureza por espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS) (Figura 2). Três picos com razão massa/carga (m/z) distintos podem ser observados neste espectro: 4551; 9109; 18185. A massa molecular do BTCI está indicada pelo pico de valor m/z 9109 correspondente a massa molecular do inibidor (VENTURA *et al.*, 1966). Os outros dois componentes indicam a dupla carga da molécula de BTCI, resultando na metade do valor de (m/z) encontrada para essa proteína (m/z 4551) e a dimerização do BTCI (m/z 18185). Esse espectro mostra que o BTCI foi purificado com grau de pureza 100%.

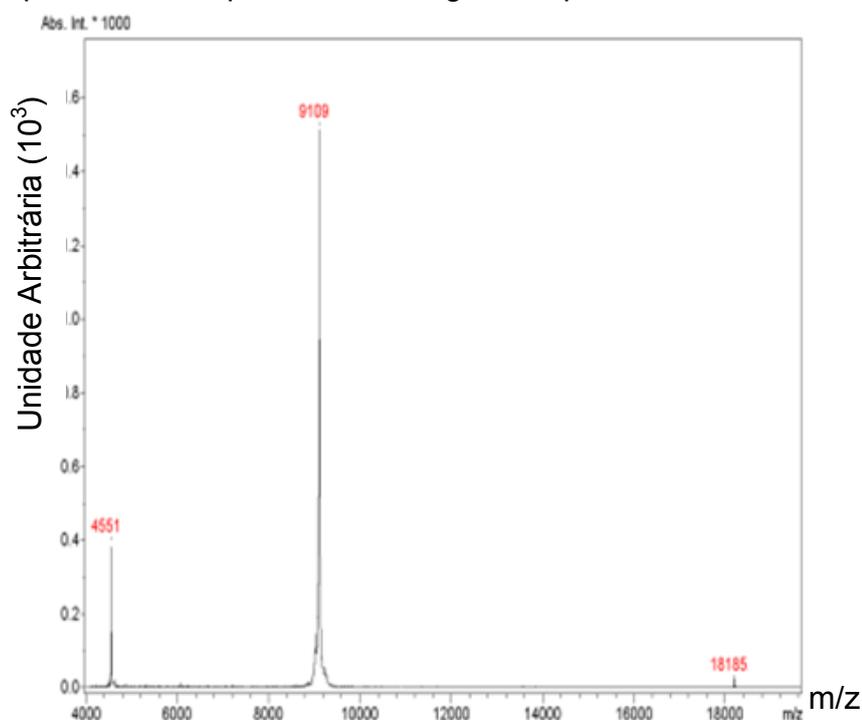


FIGURA 2. Espectro de MALDI/TOF-MS do BTCI. Os três picos correspondem, respectivamente, ao BTCI duplamente carregado (m/z 4551), BTCI puro (m/z 9109) e BTCI na forma de dímero (m/z de 18185).

5.1.2) Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão de MagDex

As dimensões das nanopartículas de maghemita que constituem o nanocompósito MagDex foram determinadas por meio da técnica de MET. Nessa

técnica a imagem é formada a partir de um feixe de elétrons de alta voltagem, que após interagir com as amostras em dimensões ultrafinas pode gerar três tipos de elétrons: os transmitidos, os inelasticamente espalhados e os elasticamente espalhados (Carvalho, 2008). Esta dispersão será tanto maior quanto maior o tamanho do átomo (átomos eletrondensos), e faz com que os elétrons que deveriam atingir o écran não o façam gerando o contraste da imagem. Em fluidos magnéticos as porções eletrondensas correspondem ao núcleo magnético. No caso da amostra de MagDex isso é representado pelo núcleo de maghemita formado por átomos de Fe^{3+} que correspondem às imagens escuras, eletrondensas. Elementos que não apresentam átomos pesados precisam passar por uma etapa de contrastação para serem visualizados por meio dessa técnica. A análise de microscopia eletrônica de transmissão não foi realizada nas amostras que apresentavam o BTCl, por não ter sido realizada a marcação específica para a proteína que permitisse a sua visualização por meio dessa técnica.

Na figura 3 está representado as fotomicrografias de MagDex obtidas por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão e o histograma da distribuição do diâmetro das partículas dos dados experimentais, como descrito e revisado por Figueiredo (2008). O diâmetro médio de MagDex foi determinado em 7,10 nm com o desvio padrão (σ) de 0,26.

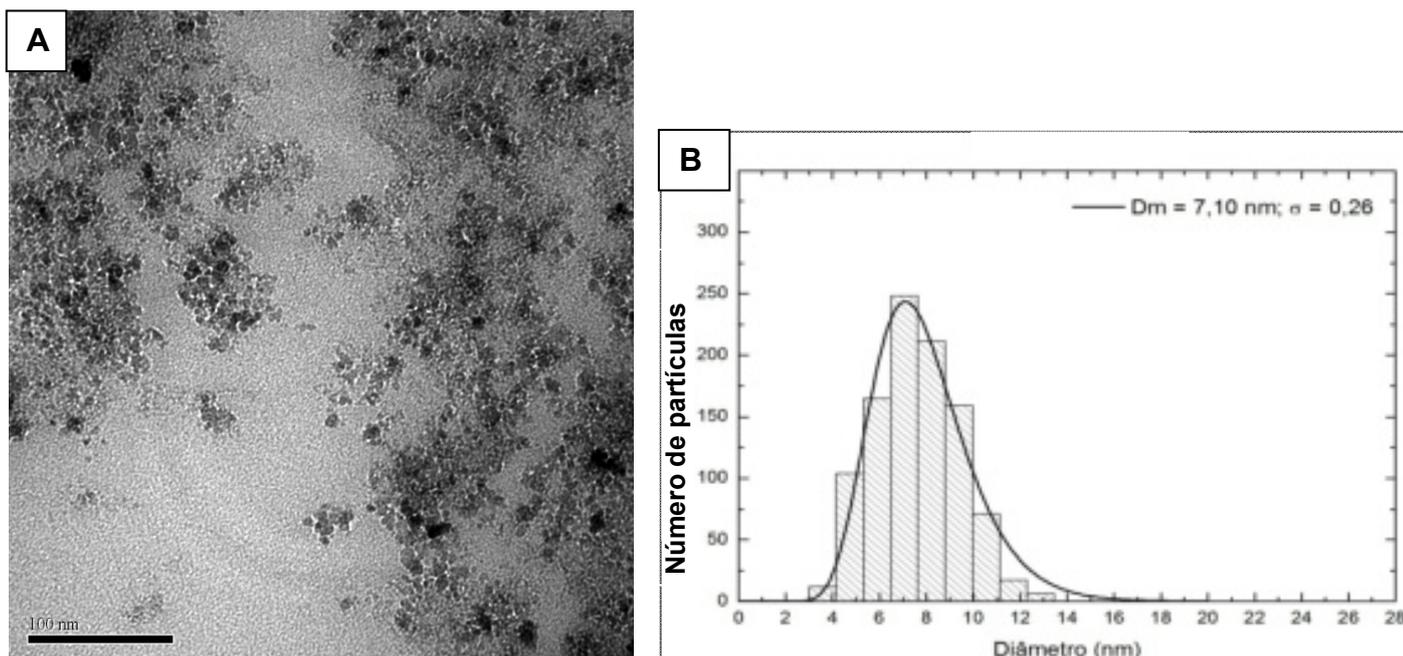


FIGURA 3. A) Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão das partículas de maghemita recobertas por dextrana (400000X). **B)** Histograma do diâmetro médio (D_m) das nanopartículas magnéticas de MagDex de 7,10 nm com desvio padrão (σ) do diâmetro médio de 0,26.

Na fotomicrografia, os pontos escuros semelhantes a grânulos, correspondem ao núcleo magnético de maghemita. Essas nanopartículas não se encontram individualizadas e existe uma matriz menos eletrondensa envolvendo os nanoímas. Provavelmente essa matriz menos eletrondensa corresponde às cadeias de dextrana adsorvidas na superfície das nanopartículas, presentes na amostra de MagDex. Isso indica que a metodologia utilizada para retirar as moléculas de dextrana adsorvidas nas nanopartículas de maghemita, descrito na sessão (4.1.7) não foi efetiva para retirar as moléculas de dextrana.

Similarmente, estudos da ultraestrutura por MET de nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas na presença de dextrana apresentaram fotomicrografias com partículas não individualizadas e com aspecto semelhante das fotomicrografias obtidas no trabalho atual (LEE et al., 2002). As fotomicrografias, deste trabalho,

também mostraram a associação das cadeias da dextrana adsorvida na superfície das NPM.

A partir da análise dessas micrografias, no trabalho atual, hipotetizou-se que essas cadeias de dextrana adicionadas durante a síntese de MagDex resultavam na formação de agregados. Para elucidar essa hipótese outras formas de caracterização estrutural da nanopartícula foram realizadas.

5.1.3) Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de BTCl e do complexo BTCl-MagDex

A topografia das amostras MagDex e BTCl-MagDex foi analisada qualitativamente por meio da MEV. Nessa técnica, a imagem é formada por elétrons secundários retroespalhados resultantes da interação do feixe eletrônico primário com a amostra que retornam à superfície da mesma e atingem o detector.

Na figura 4 estão representadas as fotomicrografias obtidas das duas amostras de MagDex (figura 4A) e BTCl-MagDex (figura 4B). Por meio de uma análise qualitativa não foi possível observar diferenças entre as amostras MagDex e BTCl-MagDex analisadas por meio dessa técnica. No entanto, a presença de aglomerados de nanopartículas foi observada nas duas amostras (indicadas pelas setas) tanto na presença, como na ausência de BTCl.

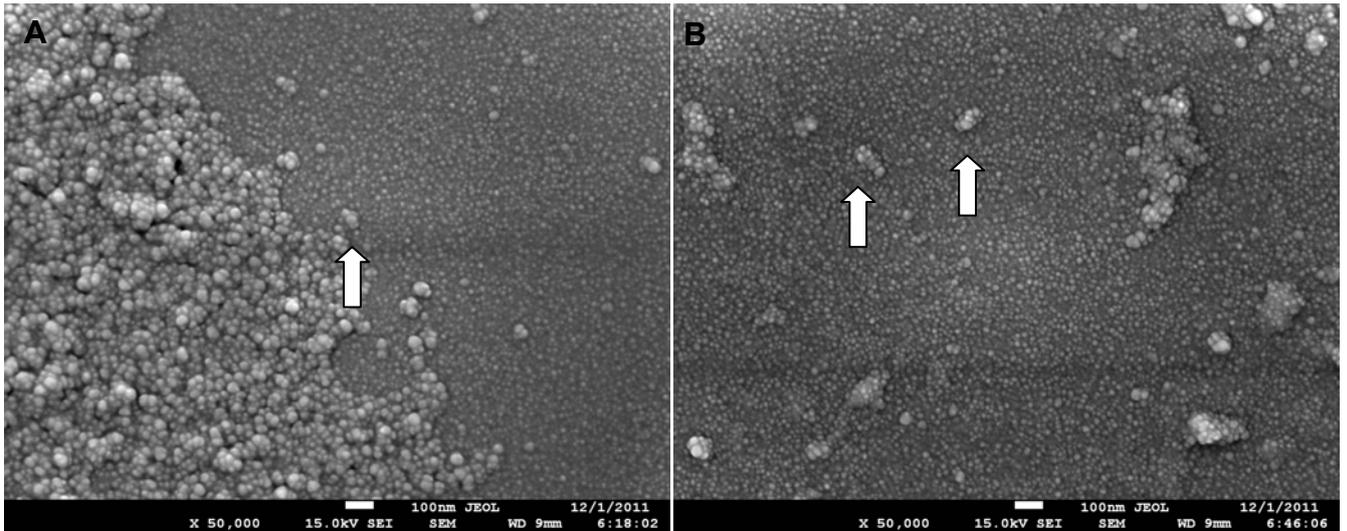


FIGURA 4. Micrografias Eletrônicas de varredura de MagDex, fluido magnético composto por maghemita recobertas por polímeros de dextrana, na presença (a) e na ausência (b) da proteína BTC1 50000(X). Setas indicam agregados de nanopartículas magnéticas.

No trabalho desenvolvido por Xu e colaboradores (2005), diâmetros maiores de partículas de magnetita recobertas com dextrana também foram observados para as análises de MEV, quando comparadas à análise por MET (XU et al., 2005). Essa diferença entre as duas técnicas pode indicar a presença de agregados de nanopartículas de MagDex.

Esses aglomerados podem ser formados a partir de associações inespecíficas entre essas partículas e podem ocorrer no mínimo de duas formas diferentes: agregação primária, quando os núcleos magnéticos se associam antes de serem recobertos pelos polímeros de dextrana; ou agregação secundária, correspondendo à associação das partículas após serem surfactadas pelo polímero de açúcar. A presença desses agregados em amostras de nanopartículas magnéticas resulta em mudanças nas características magnética das mesmas (Al et al., 2005). No entanto, os aglomerados observados nas micrografias de MEV (Figura 4) podem ser resultado da preparação das amostras para a técnica de MET e MEV

de MagDex e BTCI-MagDex, ou seja, podem ser reversíveis quando as mesmas estiverem em suspensão.

Como o estudo do sistema carreador magnético BTCI-MagDex visa a sua futura possível aplicação biomédica, a estabilidade e o tamanho das nanopartículas da suspensão magnética associada ou não ao BTCI foi avaliada na sua forma original. Os resultados dessas análises estão apresentados a seguir.

5.1.4) Avaliação do Diâmetro Hidrodinâmico da suspensão de BTCI associado ou não a MagDex

A análise realizada pela técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz (EDL) foi baseada na relação do percentual de número distribuído nas classes dos diâmetros hidrodinâmicos. Esta avaliação considera a relação de espalhamento de luz com o tamanho da partícula, pois a relação de espalhamento de luz está na ordem de 10^6 de acordo com o tamanho da partícula, ou seja, uma partícula maior espalha muito mais luz do que uma partícula menor. A relação de número *versus* tamanho resulta nos dados correspondentes à população de entidades com maior quantidade na amostra analisada. A avaliação do diâmetro hidrodinâmico de MagDex por EDL confirmou a presença dos agregados (Figura 5) observados nas micrografias de MEV e MET (Figuras 3 e 4). O valor encontrado para a amostra de MagDex, em diferentes pH (4,0; 7,4 e 10,0), foi de aproximadamente 140 nm, o que indica a associação de várias nanopartículas. Esse sistema agregado das nanopartículas apresenta-se monodisperso, pois o índice de polidispersividade (PDI) das nanopartículas é de aproximadamente 0,17 (Tabela 1).

Mesmo estando em estado agregado a dimensão das nanopartículas de MagDex em suspensão é compatível com o uso em terapias contra o câncer. Isso se

deve ao fato de que a microvasculatura do tecido tumoral é descontínua e apresenta poros que variam de 100 nm a 1000 nm, permitindo a penetração de nanopartículas nessas dimensões. Em contraste, a microvasculatura de tecidos saudáveis apresenta fenestras de dimensões de aproximadamente 10 nm de diâmetro (HUGHES, 2005), favorecendo, portanto, que tecidos cancerígenos sejam preferencialmente atingidos. Adicionalmente, estudos mostram que partículas nas dimensões de MagDex, em suspensão, apresentam maior tempo de circulação no organismo (AMAL et al., 2012).

Os valores dos diâmetros hidrodinâmicos das amostras do BTCl isolado em pH 4,0; 7,0 e 10,0 foram diferentes. As amostras de BTCl analisadas em pH ácido apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 676 nm (Tabela 1). Esse valor é muito maior do que o esperado para a molécula de BTCl que na sua estrutura cristalográfica apresenta dimensões de (4,2 x 3,22 x 3,18 nm³) (BARBOSA et al., 2007).

Em pH ácido o BTCl está próxima ao ponto isoelétrico teórico (pI) de 4,9 (<http://web.expasy.org/ProtParam>). Nessas condições, a carga elétrica residual da molécula é próxima de zero, diminuindo a repulsão eletrostática entre as moléculas, o que favorece a agregação do BTCl. No entanto, na presença de MagDex esses agregados possivelmente se associam à superfície da partícula, o que resulta em partículas de 281 nm, menor do que o valor obtido para o BTCl isolado para a condição ácida. A formação do complexo BTCl-MagDex promoveu o deslocamento do diâmetro hidrodinâmico para valores intermediários, correspondentes às dimensões entre a partícula magnética e o BTCl isolado (Figura 5A e Tabela 1).

Nos pH neutro e alcalino, o BTCI livre encontra-se principalmente na sua forma monomérica (~ 4 nm) (Tabela 1). Nessas condições a molécula de BTCI apresenta predominantemente carga residual negativa, o que permite a repulsão eletrostática da proteína, reduzindo a agregação (Figura 5B e 5C). Na presença de MagDex, o pico de espalhamento de luz, que indica essa população de moléculas, desaparece dando origem àquele correspondente ao raio hidrodinâmico do complexo BTCI-MagDex, com alguns nanômetros a mais, o que indica a formação do complexo.

Tabela 1. Diâmetro Hidrodinâmico (Dh) e PDI (índice de polidispersividade da intensidade) para as amostras de BTCI, MagDex e o complexo BTCI-MagDex, obtidos por espalhamento de luz dinâmico.

	pH 4		pH 7		pH 10	
	Dh (nm)	PDI	Dh (nm)	PDI	Dh (nm)	PDI
BTCI	676±36	0,17±0,2	4±0,83	0,72±0,3	4±1	0,49±0,1
MagDex	148±3	0,17±0,0	148±5	0,16±0,0	128±7	0,17±0,0
BTCI-MagDex	281±21	0,27±0,0	156±1	0,16±0,0	156±5	0,16±0,0

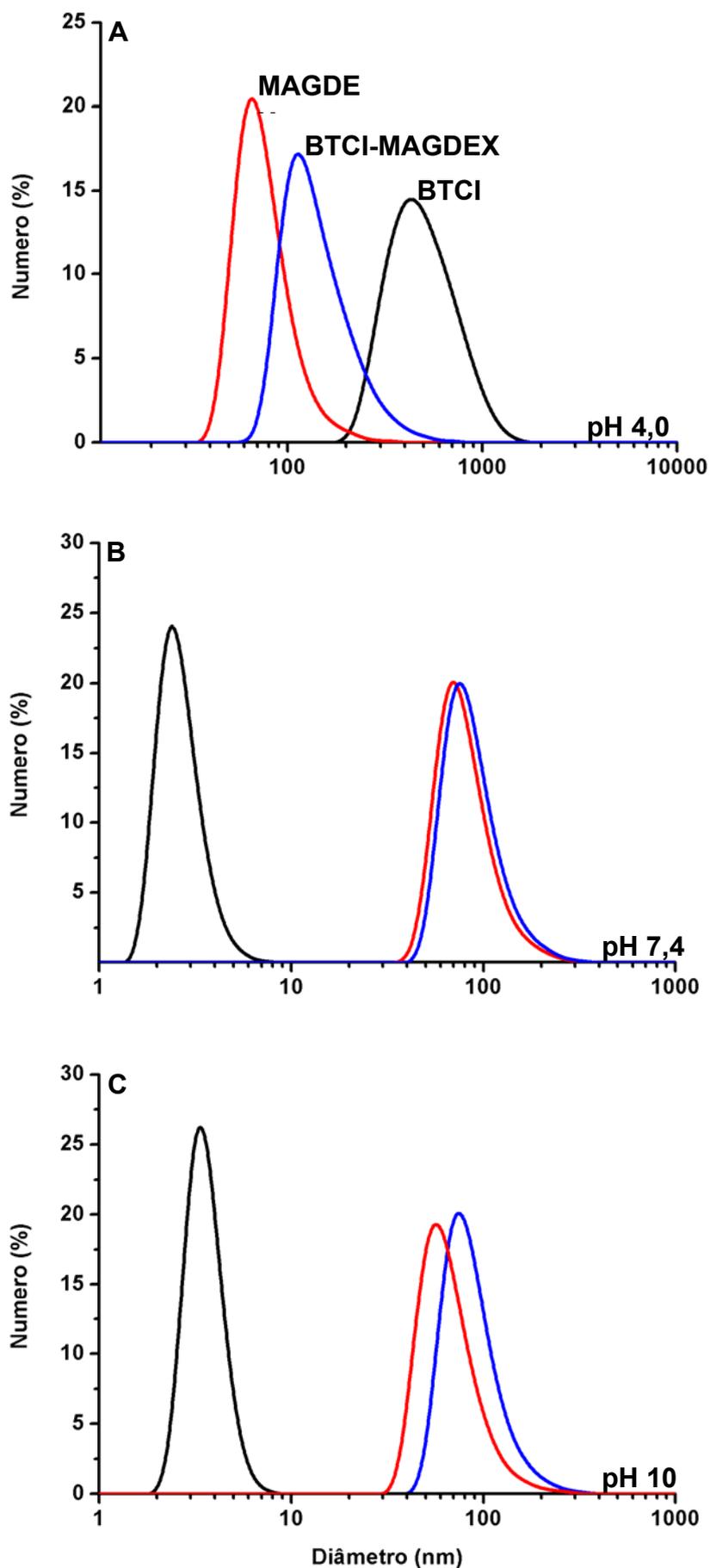


FIGURA 5. Distribuição percentual do número de partículas e diâmetro hidrodinâmico de BTCI (0,5 mg/ml) na presença ou não de MagDex em diferentes ph: a) 4,0; b) 7,4; c)10,0. A linha preta corresponde ao BTCI. A linha azul ao complexo BTCI-MagDex e a linha vermelha a MagDex.

5.2) ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO BTCI COM MAGDEX

A compreensão do processo de adsorção de proteínas em nanopartículas está diretamente condicionada à determinação de parâmetros como constante de associação (K_a), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos. Essas informações são fundamentais para formulação e melhoramento dos nanocompósitos associado às moléculas com ação farmacológica, para aplicações biomédicas. Existem diferentes formas de se investigar esses parâmetros da associação e adsorção de proteínas em nanopartículas. Uma delas é o monitoramento de diferenças conformacionais de proteínas por métodos espectroscópicos, na presença de ligantes. O estudo da associação de BTCI com o fluido magnético MagDex foi realizado, nessa dissertação, utilizando o método espectroscópico de supressão de fluorescência do único triptofil presente no BTCI, com adição crescente de MagDex, e em condições controladas de pH e temperatura.

As proteínas apresentam a fluorescência intrínseca resultante dos resíduos de aminoácidos aromáticos: triptofano, fenilalanina e tirosina. A alta sensibilidade do resíduo de triptofano com relação ao ambiente molecular e suas características estruturais o tornam uma importante sonda fluorescente para investigação das alterações na matriz proteica. Mudanças no espectro de emissão de proteínas contendo triptofanos podem resultar de transições conformacionais, associações de subunidades, ligação ao substrato, ou desnaturação da proteína. Os máximos de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$) de fluorescência deste resíduo de aminoácido encontram-se entre os comprimentos de onda de 310 a 360 nm, dependendo da polaridade, força iônica, temperatura e rigidez da matriz circundante (LAKOWICZ e MASTERS, 2008).

A redução na intensidade de fluorescência de emissão do fluoróforo triptofano pode ser resultado da presença de ligantes na proteína (YU et al., 1992), o que gera a supressão da intensidade de fluorescência. Esse fenômeno é utilizado para o estudo da interação entre ligantes e proteínas.

5.2.1) Supressão de fluorescência intrínseca do BTCl sob influência do pH e temperatura

De acordo com a estrutura primária do BTCl, o único resíduo de triptofano ocupa a penúltima posição da cadeia polipeptídica (Morhy e Ventura, 1987). As características da emissão de fluorescência em relação à variação de pH e temperatura foram analisadas a partir dos espectros de emissão deste fluoróforo na ausência de atenuadores (Figura 6). Os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ encontrados nos três pH investigados (4,0; 7,4; 10,0) foram de aproximadamente 355 nm (20 °C), o que está de acordo com os dados reportados por Ventura et al. (1977).

Os valores da intensidade de fluorescência de emissão do BTCl nos três diferentes pH a 20 °C, aumentaram com o aumento da alcalinidade: pH 4,0: 154 u.a; pH 7,4: 383 u.a; pH 10,0: 514 u.a. Essa variação da intensidade de fluorescência deste fluoróforo do BTCl, de modo pH-dependente, já tinha sido observada por Ventura (1977). Nesse trabalho a influência de grupos supressores adjacentes ao triptofil foi proposta como a origem da variação da intensidade de fluorescência de modo pH-dependente. Foi sugerido que o mecanismo de supressão envolve a transferência de um próton intramolecular de um grupo protonado para o anel indol do triptofano.

Esta forma protonada do anel indol apresenta um rendimento quântico reduzido (LAKOWICZ, 2008). A diminuição do pH favorece a protonação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, resultando em grupos supressores como carboxila não ionizada, anel imidazólico catiônico e a forma catiônica do grupo amino. Adicionalmente, a redução da intensidade de emissão de fluorescência do BTCl em decorrência do aumento de temperatura foi observada nos experimentos de fluorescência (Figura 6). Esse efeito decorre do aumento da energia cinética das partículas do solvente que leva a um aumento das colisões entre as mesmas e o

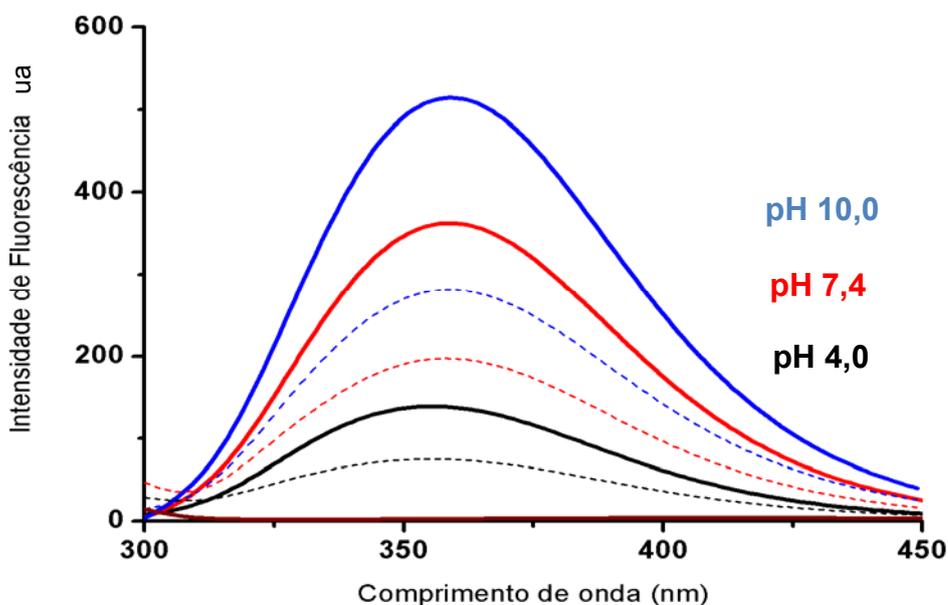


FIGURA 6. Efeito da variação de pH e de temperatura no espectro de emissão do BTCl. em azul: espectro obtido em tampão carbonato 10mm (ph 10); em vermelho, espectro obtido em tampão PBS pH (7,4); em preto, espectro obtido em tampão acetato pH 4,0. a curva na coloração marron representa o estado de saturação em todos os pH (valores da intensidade próximos a zero) e temperaturas após a adição de MagDex 0,62 mm. a linha cheia corresponde aos espectros de emissão obtidos à temperatura de 20 °C, enquanto os espectro pontilhados correspondem à temperatura de 45 °C.

fluoróforo no estado excitado. Essas colisões resultam em uma desativação não radioativa do estado excitado, reduzindo a emissão de fluorescência (LIMA, 2008).

5.2.2) Constantes de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n) do complexo BTCl – MagDex

As curvas de emissão fluorescência BTCl foram suprimidas em decorrência da adição de MagDex e estão representadas na figura 7 em diferentes pH (20 °C). Nas temperaturas de 25, 30, 35, 40 e 45 °C (dados não mostrados) foi observado o mesmo padrão de supressão obtido para a temperatura de 20 °C, porém com intensidades diferentes, decorrente do efeito da temperatura explicado anteriormente. Considerando a semelhança de todas essas curvas, optou-se por mostrar somente uma delas (20 °C) e as demais derivadas dessa.

Essa supressão do sinal de fluorescência pode ser de dois tipos: dinâmica e estática. No primeiro caso, o fluoróforo chega ao estado excitado, mas devido a interações com o agente supressor ocorre o retorno para o estado fundamental por meio de um processo não radioativo. Na supressão estática ocorre a formação de um complexo entre o supressor e a molécula, o que gera a forma não excitável, resultando na despopulação dos triptofanos excitáveis (LAKOWICZ, 2008).

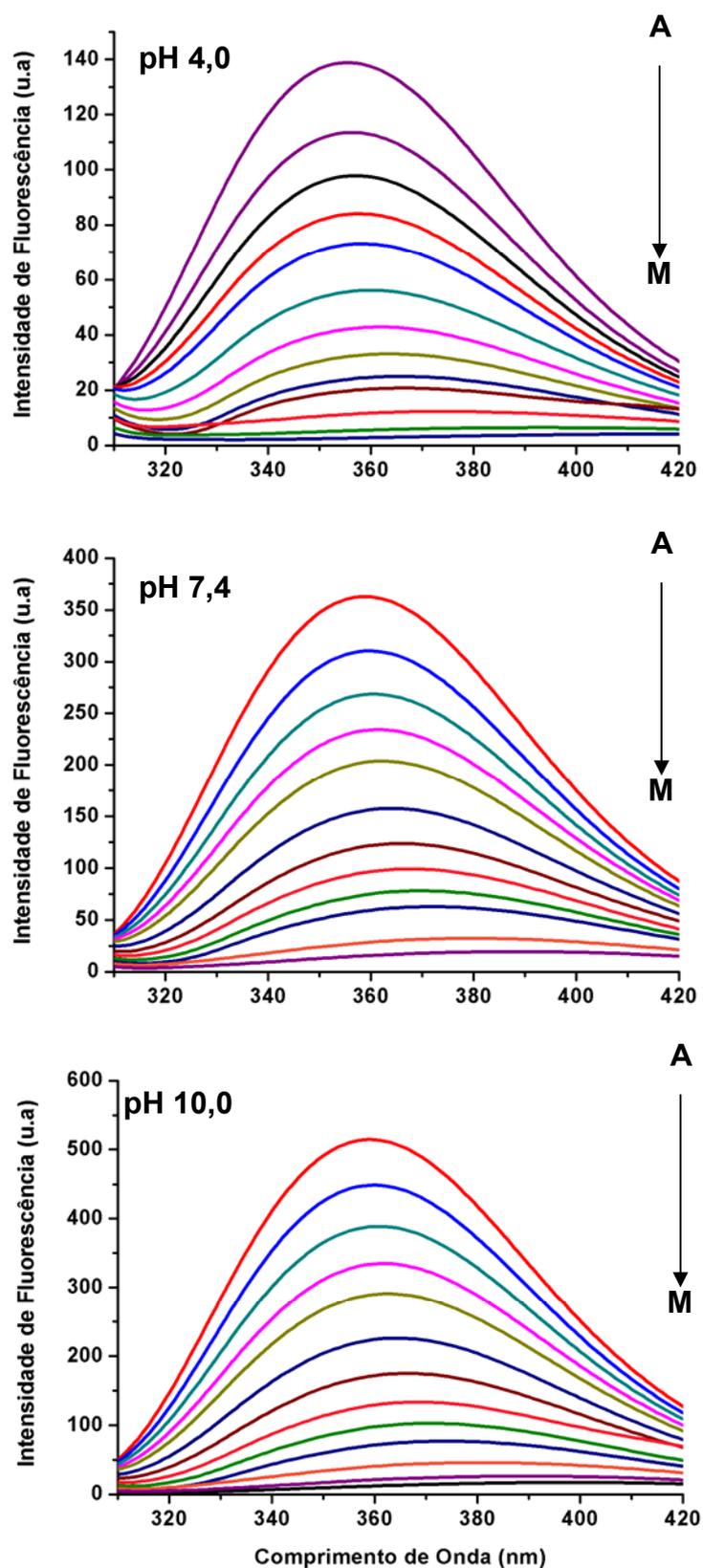


FIGURA 7. Supressão de fluorescência do espectro de emissão do BTCl por meio da titulação com MagDex. O ensaio foi realizado em diferentes pH (NaCl 0,15m) a 20 °C. As concentrações de MagDex variaram de A = [0,0] a M = [0,62] mM, considerando-se a concentração de maghemita, de acordo com a seta.

A partir da intensidade de fluorescência emitida pelo triptofil do BTCI na ausência e na presença de MagDex versus a molaridade da maghemita da partícula magnética (descrito na sessão 4.6), as constantes de associação para formação do complexo BTCI-MagDex e o número de sítios de ligação do complexo BTCI – MagDex foram calculados (Figura 8). Os gráficos das temperaturas diferentes de 20 °C não foram mostrados, por apresentarem a mesma relação de linearidade. Os valores das constantes de associação e o número de sítios de ligação do complexo estão apresentados na tabela 2 para os diferentes pH e temperaturas.

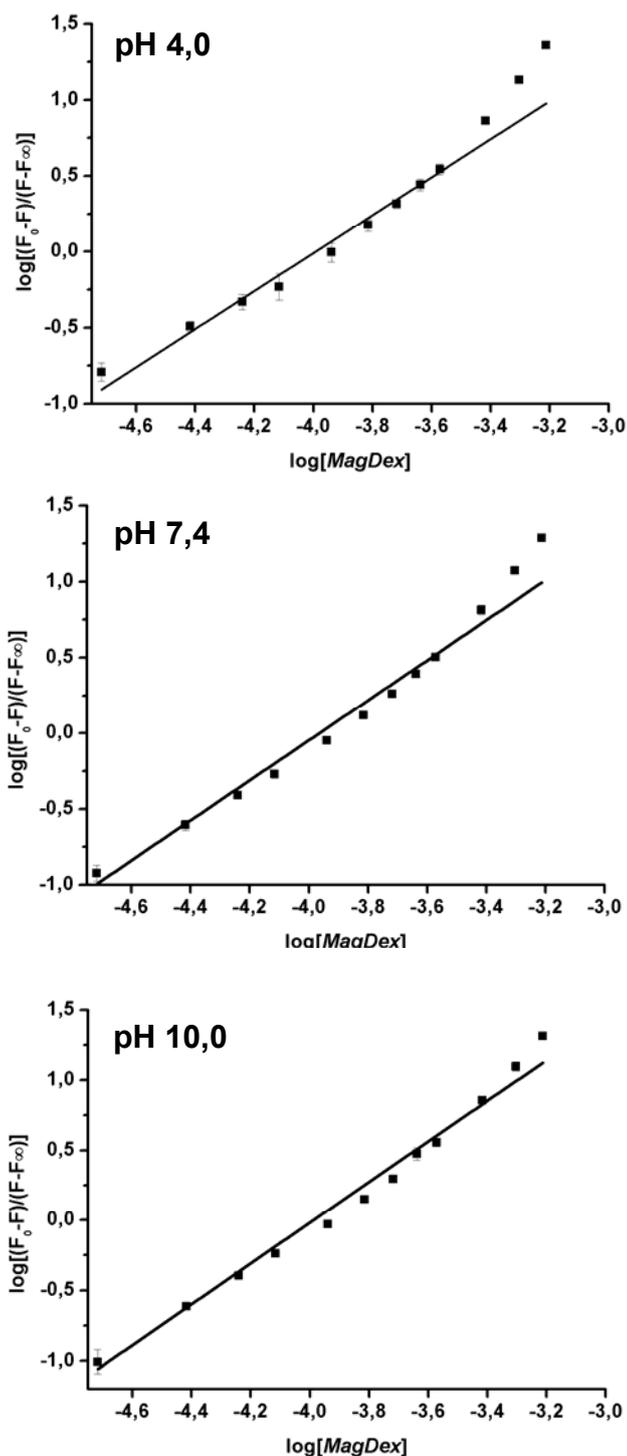


FIGURA 8. Duplo logaritmo da fluorescência do BTCl suprimida com a titulação de *MagDex* (20 °C) em diferentes pH. Índice de correlação (R^2) para os pH 4,0 e 7,4=0,98 e para o pH 10,0=0,99 ; NaCl 0,15M.

Os gráficos da figura 8 apresentam uma curvatura voltada para o eixo das ordenadas. Esse perfil de desvio da linearidade pode ser explicado pelo fato de que somente certa fração dos fluoróforos em estado excitado foi suprimida pelo processo

colisional. Os fluoróforos no estado excitado são desativados instantaneamente depois de sua formação pela molécula supressora, no caso, nanopartículas de ferro próximas (aproximadamente 2 Å) ao fluoróforo excitado, e em concentrações mais elevadas do supressor. Esse modelo de supressão é conhecido por esfera de ação (LAKOWICZ, 2008). Este é um processo intermediário entre a supressão colisional e a estática (SOARES, 2005). O estudo da interação de nanopartículas de prata com compostos não proteicos resultou no mesmo padrão da emissão de fluorescência discutida nessa dissertação (LEE et al., 2008) e naquele trabalho se hipotetizou que a supressão da emissão de fluorescência estaria relacionada com o mecanismo de esfera de ação. Apesar do estudo da interação de BTCl com MagDex ter sido realizado em diferentes pH, não foram observadas diferenças expressivas entre os valores calculados de K_a (Tabela 2). Mesmo com a influência das variações de pH na ionização de grupamentos laterais dos resíduos de aminoácidos e também nos grupamentos hidroxilas, encontrados na superfície das nanopartículas de maghemita, tanto BTCl como MagDex, apresentam baixo conteúdo de cargas opostas, nos valores de pH estudados. Esses dados sugerem que a interação eletrostática, importante componente no processo de adsorção de proteínas (PATIL et al., 2007), não é preponderante na interação de BTCl com MagDex.

Resultados semelhantes foram obtidos em estudos da adsorção da α -lactoalbumina (pI 4,3) em partículas de hematita (α -Fe₂O₃), onde foi demonstrado a adsorção, mesmo em condições eletrostáticas não favoráveis (ARAI, 1990). Neste caso, a adsorção dessa proteína é atribuída a mudanças conformacionais na molécula, o que exporia seus sítios hidrofóbicos e internos, permitindo a sua adsorção por um mecanismo hidrofóbico.

Esses resultados também podem ser corroborados pelo valor da constante de associação em pH ácido, próximo ao pI teórico do BTCl. Essa foi a maior constante de associação para a formação do complexo BTCl-MagDex, comparado com os valores obtidos nos outros pH. Nessas condições, a carga residual da molécula BTCl se encontra próxima a zero, reduzindo uma possível repulsão eletrostática por MagDex.

Os valores das constantes de associação (K_a) calculadas nas diferentes temperaturas e pH para a interação do BTCl com a MagDex foram da ordem de 10^3 e $10^4 M^{-1}$. Diferenças na característica da proteína ou do sistema carreador, como núcleo magnético e cobertura, podem influenciar nos dados obtidos com diferenças da constante de associação. Por exemplo, no estudo da associação de nanopartículas de dióxido de titânio (SUN et al., 2009), assim como nanopartículas de prata com a albumina sérica humana (MANIVEL, 2012), os valores de K_a calculados foram da mesma magnitude (10^3 e $10^4 M^{-1}$). No entanto, os valores de K_a obtidos para nanopartículas de ferrita de cobalto e magnetita recobertas com citrato ou dextrana, na associação com a albumina sérica bovina, foram da ordem de $10^8 M^{-1}$ (MACAROFF et al., 2004). Diferenças como dimensão da nanopartícula, características da proteína (LACERDA et al., 2009), tamanho da cadeia dos polímeros da cobertura, natureza física e química dos polímeros (AMAL et al., 2012) influenciam nas constantes de associação. A avaliação das constantes para a finalidade da aplicação biomédica do sistema nanoparticulado.

Tabela 2. Valores das constantes de associação (K_a) do complexo BTCl-MagDex e número de sítios de ligação (n). O ensaio foi realizado em diferentes temperaturas e valores de pH.

Temperatura (°C)	pH 4,0		pH 7,4		pH 10,0	
	n	$K_a (10^4 M^{-1})$	n	$K_a (10^3 M^{-1})$	n	$K_a (10^3 M^{-1})$
20	1,41±0,04	1,0±0,1	--	--	1,51±0,02	9,5±0,3
23	--	--	1,22±0,22	5,9±0,5	--	--
25	1,46±0,05	1,0±0,0	1,39±0,18	6,3±0,9	1,48±0,02	7,0±0,1
27	--	--	1,17±0,09	8,9±0,6	--	--
30	1,41±0,04	1,0±0,0	1,33±0,09	7,6±0,7	1,56±0,02	4,4±0,5
32	--	--	1,39±0,09	7,8±1,7	--	--
35	1,48±0,05	1,1±0,0	1,19±0,26	7,4±0,5	1,54±0,07	4,9±0,3
36	--	--	1,47±0,19	7,2±0,3	--	--
38	--	--	1,16±0,18	8,7±1,0	--	--
40	1,46±0,04	1,1±0,0	1,16±0,27	7,4±6,0	1,64±0,09	2,3±0,3
45	1,53±0,01	1,1±0,1	--	--	1,92±0,08	0,8±0,8

O valor de K_a em $10^4 M^{-1}$ encontrado para o complexo BTCl-MagDex mostra que BTCl apresenta menor afinidade com o carregador magnético do que por suas enzimas cognatas quimotripsina e tripsina (K_a : 10^8 e $10^7 M^{-1}$) (FACHETTI et al., 1984; FREITAS et al., 1999). No presente estudo, levando em consideração que se

almeja a liberação dessa molécula para a inibição das enzimas alvo no sítio de ação, como no tecido tumoral, os valores obtidos para a constante de afinidade representam uma característica que pode ser considerada importante para essa aplicação biomédica, pois o carreador magnético não compete com as moléculas alvos.

Os valores dos números de sítios de ligação, nas diferentes temperaturas e pH, apresentou uma média de 1,4. Embora BTCl e MagDex apresentem a mesma carga líquida, a proteína apresenta uma carga superficial heterogênea determinada pela natureza química de cada aminoácido e da exposição dos mesmos ao solvente. Por vezes um único aminoácido pode ser responsável pela adsorção da proteína a uma nanopartícula, ou um grupo de cadeias laterais de aminoácidos distintos podem determinar a especificidade entre as moléculas envolvidas (EROL et al., 2006).

Os valores das cargas residuais superficiais de BTCl, MagDex e do complexo foram determinados pelos valores do potencial zeta (ζ) para avaliar as condições de adsorção dessas moléculas nos diferentes pH. As medidas da carga superficial residual do BTCl e dos valores encontrados para o potencial zeta do BTCl, MagDex e BTCl-MagDex mostram que as mudanças nas cargas superficiais dessas amostras ocorre de forma pH dependente (Tabela 3). As nanopartículas de maghemita contém hidroxilas (Fe-OH^{2+}) que em pH ácido encontram-se desprotonadas, resultando em uma carga superficial positiva, como mostrado pelo valor do potencial zeta para a partícula isolada. O aumento da alcalinidade resulta na carga residual negativa da partícula, devido à desprotonação das hidroxilas (Fe-O^-) (LUCAS et al., 2007).

O perfil do potencial zeta de nanopartículas de maghemita sem cobertura em função do pH apresentou o mesmo padrão dos valores para as nanopartículas de

MagDex (Tabela 3), no entanto com valores em módulo maiores do que os encontrados no presente estudo (YU, 2004). Provavelmente essa redução dos valores do potencial zeta deve estar relacionada com fato de a dextrana ser um polímero polar sem carga (PORFIRE et al., 2009).

Tabela 3. Potencial Zeta obtidos por espalhamento dinâmico da Luz ζ em diferentes valores de pH

	pH 4	pH 7,4	pH 10
	Potencial ζ (mV)		
BTCI	-14,46	-31,26	-31,53
MagDex	7,09	-8,37	-10,76
BTCI-MagDex	0,56	-7,83	-9,91

5.2.3) Parâmetros termodinâmicos da associação entre BTCI e MagDex

Diferentes fenômenos físicos e químicos envolvendo macromoléculas contribuem para a afinidade entre elas. Estes estão diretamente relacionados com os tipos de ligações não covalentes, incluindo as ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A determinação dos parâmetros termodinâmicos, como entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG) das associações entre moléculas são fundamentais para elucidar as características da ligação. Por meio dos valores desses parâmetros a dinâmica das reações estudadas pode ser compreendida assim como a estabilidade da formação do complexo em associações com proteínas.

Desta forma, para se compreender a dinâmica da associação de BTCI com a MagDex esses valores foram calculados por meio da aproximação de van't Hoff que

relaciona o logaritmo natural (Ln) das constantes de associação (Ka) para a formação do complexo BTCI – MagDex versus o inverso das temperaturas (K) (Figura 9).

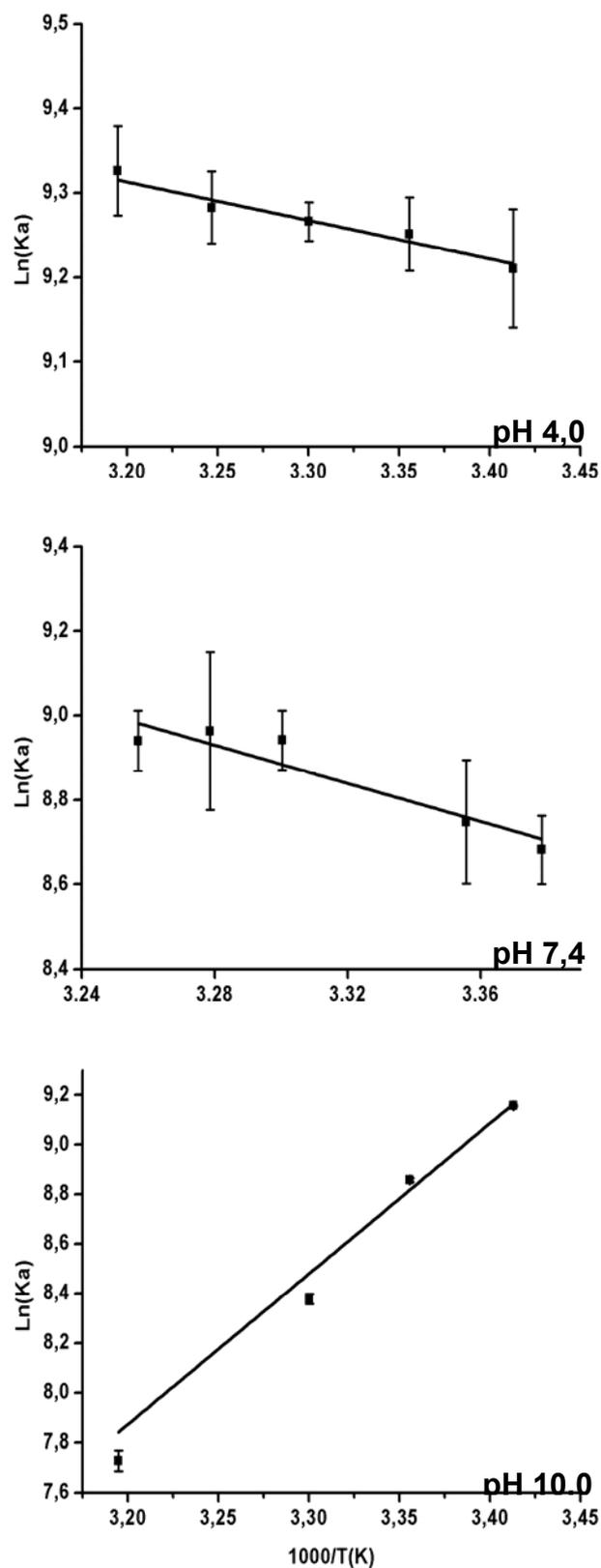


FIGURA 9. Aproximação de van't Hoff para a formação do complexo BTCl-MagDex em diferentes pH. Por meio dessa relação foram calculados a variação de entalpia (ΔH) e de entropia (ΔS). O índice de correlação (R^2) para os pH 4,0 e 7,4 foi de 0,94. No pH 10,0 o índice foi de 0,99. As barras representam o erro padrão que foi considerado no cálculo do R^2 .

Os valores dos parâmetros termodinâmicos da associação do BTCI com MagDex, em condições ácidas e neutras foram: entalpia (ΔH) com valores positivos e próximo de zero, entropia com valores positivos ($\Delta S > 0$) (tabela 4). Esses dados indicam que a interação de BTCI com a MagDex, nessas condições, pode ser principalmente devido às interações hidrofóbicas (ROSS, 1981).

A molécula de BTCI apresenta superfície hidrofóbica (BARBOSA et al., 2007) constituída por cadeias laterais de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Esses resíduos não polares levam a água a formar uma estrutura organizada na vizinhança dos grupos hidrofóbicos quando isolados no solvente (ROSS, 1981). Com a formação do complexo com MagDex esses resíduos que se encontravam previamente acessíveis, se tornam inacessíveis, o que gera o aumento no número de moléculas de águas não estruturadas que são expulsas para o corpo do solvente, aumentando a entropia do sistema (WEBER, 1995).

No estudo sobre a reação do BTCI com a sua enzima cognata, α -quimotripsina (FREITAS et al., 1999) em pH 7,6, os valores encontrados para os parâmetros termodinâmicos também foram positivos para a variação de entalpia e entropia (tabela 4). No estudo referido, a dinâmica da associação do inibidor com a protease foi atribuída ao aumento de entropia do sistema devido à exclusão de águas da superfície de associação das duas proteínas.

Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos determinados para a formação do complexo entre o BTCl e MagDex. Os valores de entalpia (ΔH_{vh}), entropia ΔS e energia livre de Gibbs a 25°C (ΔG^{25}) nos diferentes pH, estão apresentados.

	pH 4,0	pH 7,4	pH 10,0	BTCl- α -quimotripsina (Freitas <i>et al</i> , 1999)
ΔH_{vh} (kcal/mol)	0,9 \pm 0,6	4,4 \pm 1,6	-12,0 \pm 0,2	11,1 \pm 2,5
ΔS (cal/molK)	21,5 \pm 2,1	32,3 \pm 5,5	-22,8 \pm 0,2	67,8 \pm 0,0
ΔG^{25} (kcal/mol)	- 5,5 \pm 0,1	- 5,1 \pm 0,3	- 5,2 \pm 0,0	9,1 \pm 0,0

Os valores negativos encontrados para os parâmetros termodinâmicos da associação de BTCl-MagDex em pH básico podem indicar uma associação atribuída a ligações de hidrogênio (ROSS, 1981). Além disso, esses valores podem estar relacionados com elétrons π de cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos ionizados, principalmente a tirosina, presente na cadeia polipeptídica do BTCl. Esse aminoácido apresenta o pK de ionização próximo a 10,0, ou seja, em pH alcalino a cadeia lateral desse aminoácido pode estar carregada negativamente aumentando a polarização dos elétrons π do anel aromático.

A redução da entropia do sistema pode ser atribuída à diminuição do grau de liberdade dos átomos que compõe a proteína. Os valores negativos para entropia podem decorrer das mudanças nas ligações de hidrogênio (MAKHATADZE, 1995), quando essas ocorrem em ambientes de baixa constante dielétrica, como na área de contato do complexo, sem acesso a água.

A associação do BTCl com MagDex foi caracterizada como um processo exergônico ($\Delta G < 0$) nos pH analisados. Mesmo com as diferentes contribuições dos parâmetros termodinâmicos de entropia e entalpia em cada pH avaliado, a adsorção

de BTCl à superfície do sistema magnético MagDex é um processo que pode ser considerado espontâneo.

5.3) ALTERAÇÕES DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS DO BTCl QUANDO ASSOCIADO A MAGDEX

5.3.1) Conteúdo de estrutura secundária do BTCl associado à MagDex

As mudanças da estrutura secundária do BTCl quando associado à MagDex foram comparadas com a proteína livre por meio dos espectros dicróicos obtidos na faixa de comprimento de onda longe da região do ultravioleta (UV distante), em tampão PBS, pH 7,4 a 25°C (Figura 10A) e por meio do cálculo do conteúdo de estruturas secundárias (Figura 10B).

A partir dos cálculos do percentual do conteúdo das estruturas secundárias foi observado que os dois tipos predominantes de estruturas secundárias no BTCl são as estruturas do tipo β -anti-paralelas e desordenadas (Figura 10B). As estruturas tridimensional dos inibidores da família Bowman-Birk são conservadas e basicamente formadas por estruturas do tipo β , que constituem os dois subdomínios contendo os sítios reativos (VOSS et al., 1996; PARK et al., 2004).

Os espectros dicróicos e o conteúdo de estruturas secundárias do BTCl livre e complexado com MagDex foram similares, o que mostra que esse inibidor não apresenta mudanças conformacionais quando forma o complexo com a nanopartícula magnética. A manutenção do conteúdo da estrutura secundária do BTCl na forma do complexo BTCl-MagDex pode ser devido à estabilidade estrutural decorrente do alto conteúdo de ligações dissulfeto.

Em contraste, em estudos similares com nanopartículas de prata e proteínas de diferentes classes estruturais foram observadas alterações nos espectros dicróicos. Neste estudo da interação da transtirretina humana, molécula transportadora de retinol (ALMEIDA, 1995), proteína homotetramérica do tipo β , foi observada redução no conteúdo de alfa hélice e aumento da estrutura desordenada (LAERA et al., 2011).

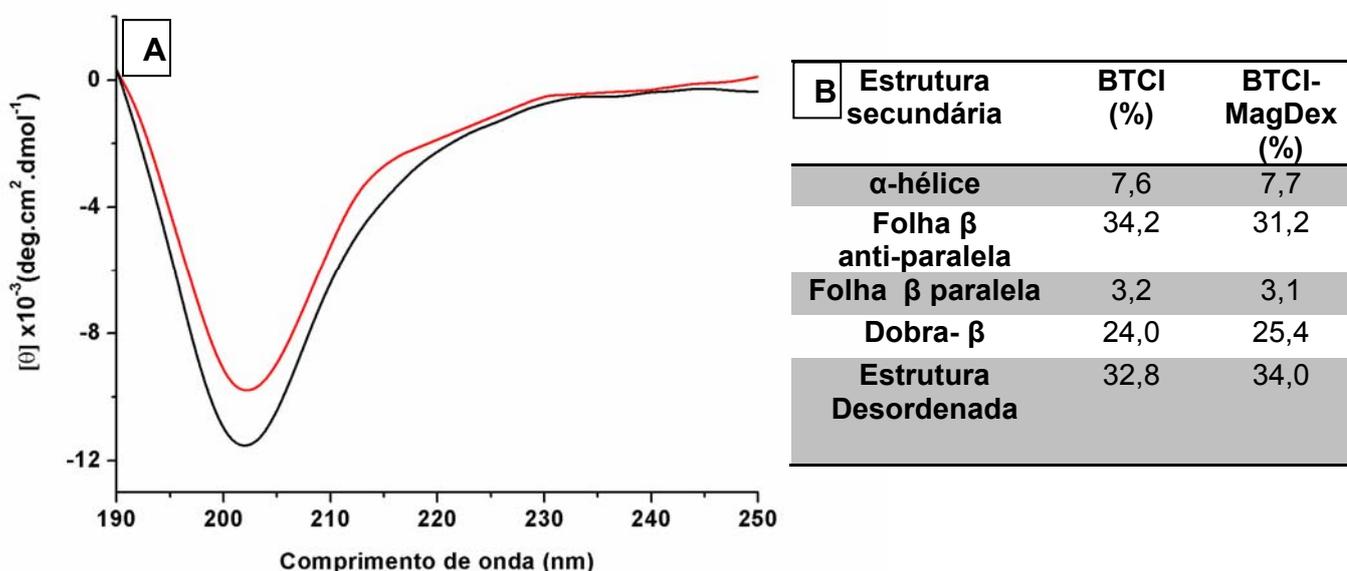


FIGURA 10. A) Espectros de dicróismo circular distante da região do UV (190-260 nm) em tampão PBS, pH 7,4 a 20°C do BTCl livre (Preto) e associado com MagDex (Vermelho). B) A tabela inserida mostra a percentagem das estruturas secundárias calculadas a 25 °C.

5.3.2) Atividade inibitória de BTCl associado ou não a MagDex

A atividade inibitória de BTCl e de BTCl-MagDex sobre a tripsina e quimotripsina foi avaliada para verificar se a atividade da proteína era preservada na presença do fluido magnético. O gráfico do ensaio inibitório está representado na figura 11, onde se observa que a curva de inibição do complexo BTCl-MagDex apresenta o mesmo padrão da curva de inibição do BTCl livre e o mesmo perfil do

percentual de inibição para as duas serinoproteases. No estudo sobre a utilização da cistatina, inibidor de cisteíno proteases, nanoestruturado em polímeros de ácido poli láctico-glicólico (PLGA), foi demonstrado que esses inibidores mantiveram a sua atividade inibitória contra a papaína (CEGNAR et al., 2004). Este inibidor é conhecido como um agente quimioterápico por inibir a atividade da cisteíno protease catepsina relacionada com a progressão da tumorigêneses.

Em contraste, de forma geral, trabalhos sobre imobilização de enzimas, por exemplo, desidrogenase alcoólica, acetil colinesterase e fosfatase, em nanopartículas magnéticas mostram que as atividades dessas moléculas ligadas tendem a diminuir se comparadas à enzima livre (LIAO, 2001; MEHTA et al. 1997; WANG et al, 2009). A mudança na atividade dessas enzimas está relacionada com mudanças conformacionais que poderiam alterar o sítio catalítico delas e a sua associação ao substrato.

A atividade inibitória do complexo BTCl-MagDex contra quimotripsina e tripsina foi semelhante à atividade do BTCl livre, indicando que a adsorção da partícula não alterou as propriedades do sítio reativo dessa proteína. Como foi discutido anteriormente, este inibidor apresenta alta estabilidade estrutural, fato que pode explicar a manutenção da sua atividade inibitória mesmo associada às nanopartículas magnéticas. Esses dados indicam que o sítio reativo está acessível para a ligação com as enzimas cognatas. No entanto, não sabemos qual é o sítio de associação entre o BTCl e a nanopartícula magnética e, portanto, não podemos inferir se existe uma competição ou associação preferencial com as enzimas cognatas e carreador magnético.

Este resultado indica que o sistema BTCI-MagDex pode ser utilizado em ensaios in vitro e in vivo, visando a busca por alternativas na prevenção e tratamentos anticarcinogênicos, considerando que essa molécula já foi previamente caracterizada como potencial agente anticarcinogênico contra o câncer de mama (JOANITTI et al., 2010).

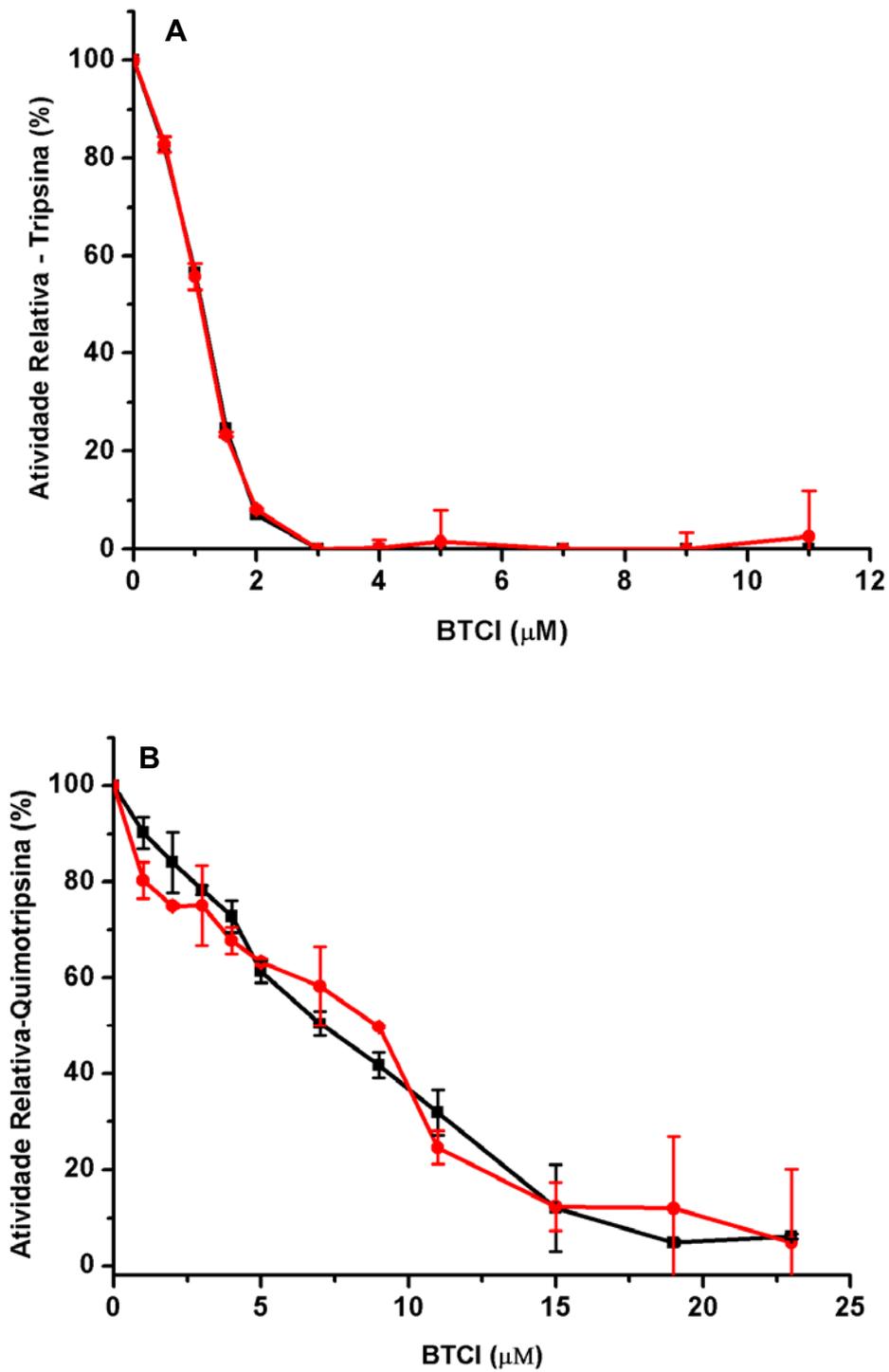


FIGURA 11. Atividade inibitória do BTCL livre (linha PRETA) E BTCL-MagDex (linha vermelha). Atividade residual A) tripsina e B) quimotripsina.

5.3.2) Avaliação das características magnéticas de MagDex e BTCI-MagDex e da sedimentação magnética desse sistema.

A separação do BTCI adsorvido em MagDex foi realizada por sedimentação magnética com ímãs permanentes para se confirmar a associação do BTCI a MagDex e avaliar a estabilidade e taxa de associação dessa proteína à nanopartícula magnética. A figura 12 mostra o sistema utilizado para essa separação magnética, constituído de tubos de vidro e uma base magnética. A figura mostra a sedimentação magnética da amostra BTCI-MagDex, utilizando gradiente de campo de cinco kgauss, determinado por um gaussímetro.

Após 48 horas observa-se que as nanopartículas associadas ao BTCI se concentraram no fundo dos tubos de vidro. Na parte superior encontra-se uma porção com coloração amarronzada decorrente das nanopartículas que não responderam a esse gradiente de campo magnético e o BTCI não associado (Figura 12 B). A quantificação de BTCI associado foi realizada a partir do método de dosagem de proteínas determinando a concentração de proteína do sobrenadante e subtraindo esse valor da quantidade inicial de proteína adicionada nesse sistema. O valor encontrado foi de 89 ± 7 % de BTCI associado às partículas magnéticas, o que indica a alta taxa de adsorção da proteína no sistema magnético.

Os resultados encontrados demonstram a estabilidade do complexo BTCI-MagDex e a alta taxa de associação do BTCI com as nanopartículas magnéticas. Esse método de adsorção e separação magnética permitiu avaliar as amostras do complexo BTCI-MagDex constituído de partículas que apresentem resposta ao campo magnético. Adicionalmente, esse procedimento pode ser considerado adequado para o direcionamento magnético e aplicação da magnetohipertermia

dessas amostras de BTCl-MagDex em tecidos alvos atingidos por um determinado tipo de câncer, estudos esses que estão em fase de elaboração.

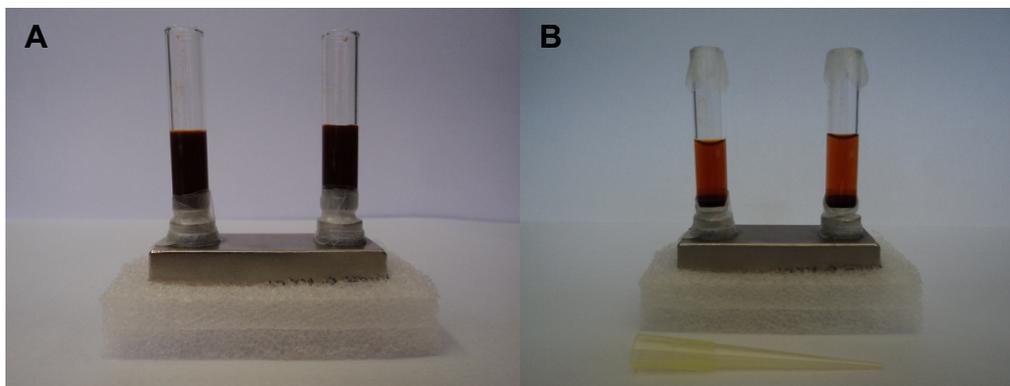


FIGURA 12. Sedimentação magnética do complexo BTCl-MagDex a 4 °C. A) BTCl-MagDex colocado no tempo zero no sistema de separação magnética; B) Após 48hs, as nanopartículas contendo BTCl-MagDex atraídas magneticamente para o fundo dos tubos (marrom escuro) e sobrenadante contendo BTCl não adsorvido e nanopartículas que não respondem ao campo (marrom claro).

5.3.3) Avaliação das características magnétoópticas de MagDex e BTCl-MagDex e da separação magnética desse sistema

Na figura 13 estão representadas as curvas de birrefringência magnética de MagDex e BTCl-MagDex na diluição de (1:2). As curvas obtidas para as outras diluições apresentaram o mesmo padrão e não estão mostradas. O sinal luminoso da birrefringência (I) em função do campo magnético externo $H(Oe)$ aplicado está relacionado neste gráfico. Os dados experimentais do sinal de birrefringência foram ajustados a partir do modelo matemático descrito por Stein (2010), resultando na curva que relaciona o percentual das contribuições para o sinal luminoso de birrefringência dos agregados e partículas isoladas que compõem a amostra. A tabela 5 correlaciona a percentagem dessas duas populações e o número de partículas por agregados das amostras MagDex e BTCl-MagDex, obtidas em todas

as diluições, a partir das curvas de birrefringência. Em MagDex e BTCI-MagDex, em todas as diluições estudadas, duas populações de nanopartículas foram identificadas: partículas isoladas (linha azul para diluição 1:2 representada na figura 13) e agregados com o mesmo número de partículas (linha vermelha para diluição 1:2 representada na figura 13).

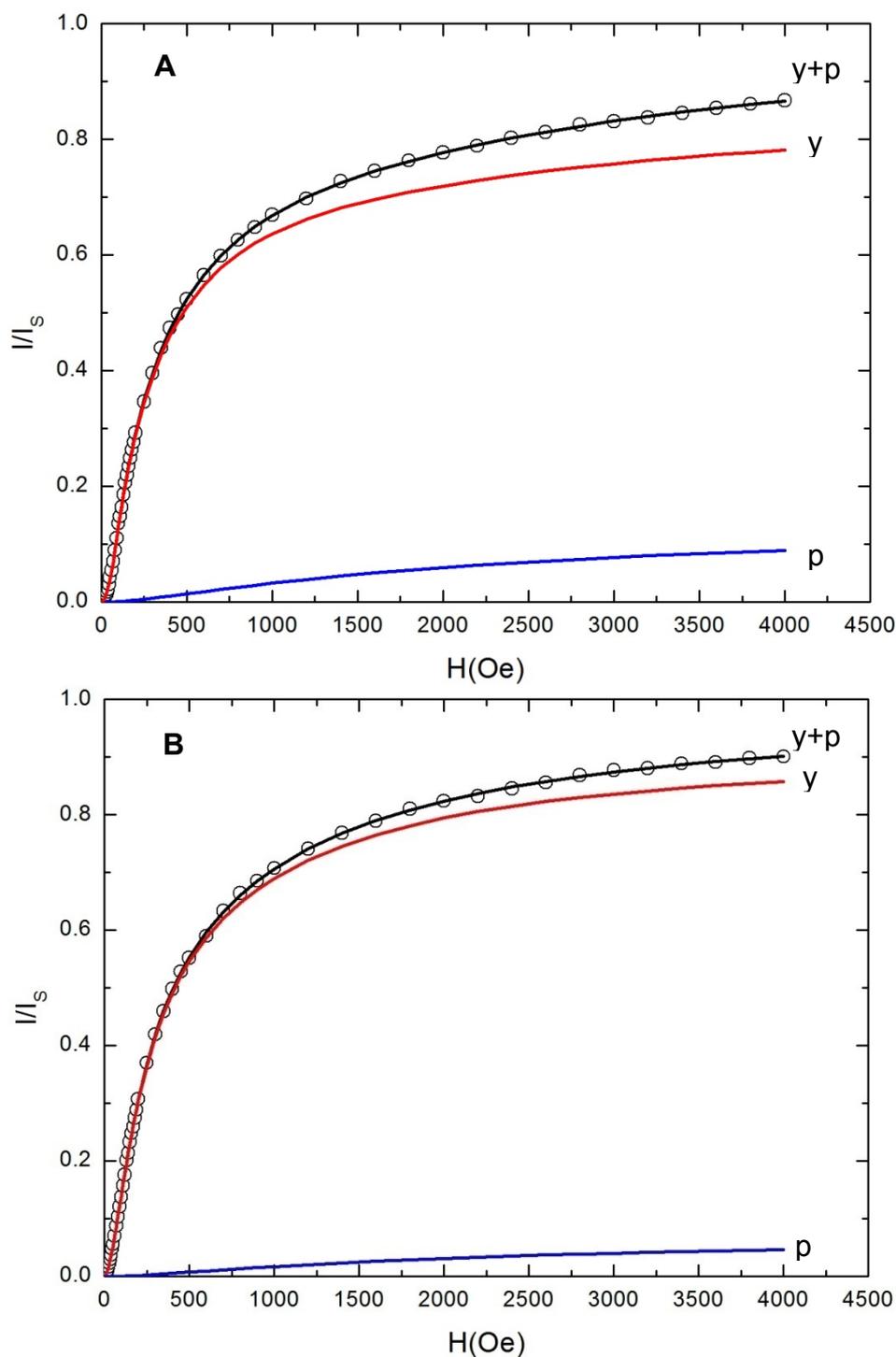


FIGURA 13. Birrefringência Magnética Estática em função do campo magnético externo aplicado para MagDex (A) e BTCl-MagDex (B) na diluição (1:2). A linha sólida preta é o ajuste aos dados do sinal luminoso (I) normalizado, correspondente a soma das contribuições do sinal de birrefringência dos agregados (linha vermelha-(y)) e nanopartículas magnéticas isoladas (linha azul-(p)).

Nas três diluições (1:2; 1:4; e 1:8), a amostra que continha proteína adsorvida apresentou o percentual de agregados maior do que a amostra do nanocompósito

sem a proteína (Tabela 5). Ao longo das diluições estudadas, o número de nanopartículas por agregado se manteve constante, demonstrando que esta organização das partículas é estável não sendo afetada pelo processo de diluição. O processo de adsorção do BTCI não alterou o número de nanopartículas por agregados quando comparados à amostra de MagDex sem a proteína.

Tabela 5. Percentual das contribuições de partículas magnéticas no sinal de luz da birrefringência magnética estática. Os valores de Hma representam o campo aplicado que gera a maior susceptibilidade magnética das amostras.

	1:2		1:4		1:8	
	MagDex	BTCI-MagDex	MagDex	BTCI-MagDex	MagDex	BTCI-MagDex
Partículas Isoladas (%)	14,4	7,4	12,4	8,4	11,1	9,9
Agregados (%)	85,6	92,6	87,6	91,6	88,9	90,1
N. Partícula	5,5	6,8	6,0	6,2	5,8	5,4
Hma (Oe)	329	298	324	301	321	303

Os resultados de birrefringência magnética corroboram com os resultados obtidos por espalhamento dinâmico de luz, onde foi mostrado a presença de agregados na amostra MagDex. Isso indica que no processo de adsorção do polímero de dextrana, agregados de nanopartículas foram formados e estão interagindo magneticamente. A existência desses agregados já havia sido visualizada também por microscopia eletrônica de varredura (Figura 4).

No gráfico 14 estão representadas as curvas de susceptibilidade magnética indicando os valores de Hma correspondentes ao máximo da função da susceptibilidade magnética nas três diluições estudadas, tanto para MagDex como

para BTCl-MagDex. Os valores encontrados para Hma estão resumidos na tabela 5 e estão na mesma faixa de valores para as duas amostras estudadas. O que difere entre as curvas de susceptibilidade para MagDex e BTCl-MagDex é que para as amostras que apresentam a proteína a curva é mais estreita e não se altera com as diluições. Em contraste, as curvas de susceptibilidade magnética das amostras de MagDex são mais largas e alteram com o processo de diluição.

A manutenção da forma das curvas de susceptibilidade magnética para as amostras com o BTCl adsorvido pode indicar que a presença da proteína no sistema resultou na maior estabilidade do sistema, mantendo sempre as nanopartículas que compõe os agregados estáveis e com uma mesma distância entre si. Isso sugere que, na presença do BTCl, moléculas do solvente não tem mais acesso ao interior dos agregados mantendo o sistema estável mesmo após as diluições.

Os resultados obtidos por meio da birrefringência magnética podem reforçar a interpretação dada para os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para a associação BTCl-MagDex, discutidos anteriormente (sessão 5.2.3). Nesse caso, foi observado que a associação do BTCl com MagDex é dirigida por um processo entrópico, decorrente da exclusão de águas da interface do BTCl e MagDex e também das moléculas de águas estruturadas em volta dos resíduos hidrofóbicos das moléculas de BTCl, para o corpo do solvente. Esta dinâmica da exclusão do solvente durante o processo de associação de BTCl a MagDex pode ter sido responsável pela manutenção da estrutura e das propriedades magnéticas de MagDex. Essa característica de estabilização do sistema magnético é fundamental para aplicações biomédicas, considerando-se que nesses casos utiliza-se amostras diluídas no sistema *in vivo* (LI *et al*, 2009).

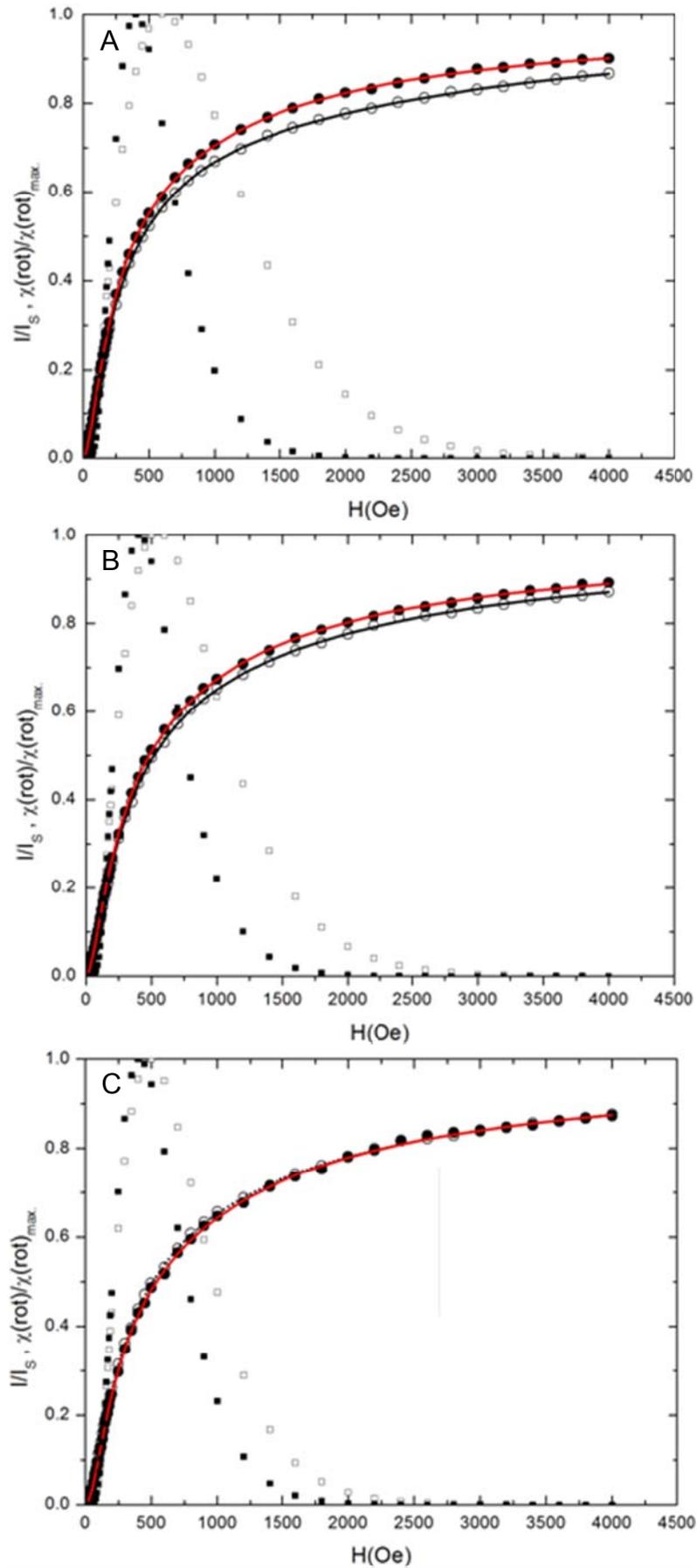


FIGURA 14. Birrefringência Magnética Estática em função dos valores de campo magnético externo das curvas de susceptibilidade das amostras de MagDex (\square) e BTCl-MagDex. (\blacksquare). Nas diluições: A) 1:2; B) 1:4 e C) 1:8.

6.CONCLUSÕES

1. A amostra de fluido magnético usada neste trabalho é constituída por nanopartículas de maghemita com diâmetro de 7 nm e diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 150 nm, o que reflete que essas partículas não se encontram isoladas quando em suspensão. A formação de associações entre as nanopartículas ocorrem de forma homogênea, como indicado pelo baixo valor do índice de polidispersividade (0,17);
2. O valor do diâmetro hidrodinâmico do complexo BTCl-MagDex foi de 156 nm nos pH neutro e alcalino e 281 nm no pH ácido. Nessas amostras nenhum pico correspondente ao diâmetro da proteína foi observado o que sugere que o BTCl interagiu com as nanopartículas de MagDex;
3. As constantes de associação do complexo BTCl-MagDex, obtidas por fluorescência, em pH ácido foi da ordem de 10^4 M^{-1} , enquanto em pH neutro e básico esses valores foram da ordem de 10^3 M^{-1} . As análises de zeta potencial indicaram que a associação desse complexo deve ocorrer principalmente por interações não eletrostáticas;
4. Os parâmetros termodinâmicos demonstraram que a associação de BTCl a MagDex em pH ácido e neutro decorre de uma reação espontânea entropicamente dirigida e principalmente atribuída às interações hidrofóbicas;
5. A associação de BTCl a MagDex em pH alcalino é espontânea e principalmente atribuída às ligações de hidrogênio formadas em ambientes de baixa constante dielétrica;
6. A associação de BTCl com as nanopartículas de MagDex não alterou de forma significativa o conteúdo das estruturas secundárias do BTCl;

7. A atividade inibitória do BTCI associado a MagDex apresentou o mesmo perfil de inibição da proteína livre demonstrando que a associação não afeta os sítios reativos da molécula;
8. A quantificação do BTCI do complexo BTCI-MagDex mostra que cerca de 80% da proteína usada foi associada às nanopartículas magnéticas;
9. As amostras MagDex e BTCI-MagDex apresentaram duas populações principais: nanopartículas isoladas (10%) e nanopartículas agregadas contendo entre 5 e 6 nanopartículas (90%), como indicado pelos dados obtidos por meio da técnica de Birrefringência magnética Estática;
10. O valor do campo magnético no qual as amostras de BTCI-MagDex apresentam a maior resposta de susceptibilidade se manteve constante ao longo das diluições estudadas assim como as curvas de susceptibilidade magnética. Provavelmente as moléculas de BTCI se associaram a MagDex excluindo as moléculas de água próximas às cadeias de dextrana, preservando as propriedades magnéticas e a estabilidade do nanocompósito mesmo nas amostras diluídas do complexo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXIOU, C., ARNOLD, W., KLEIN, R.J., PARAK, F.G., HULIN, P., BERGEMANN, C., ERHARDT, W., WAGENPFEIL, S., LUEBBE, A.S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. **Cancer research**, v. 60, n. 23, p. 6641, 2000.

ALMEIDA, M. R. R. Caracterização genética e bioquímica de variantes moleculares de transtirretina. DISSERTAÇÃO DE DOUTORADO. PORTUGAL- PORTO, 1995.

AMAL, R., WIOGO, H.T.R., LIM, M., BULMUS, V., WOODWARD, R.C., GUTIERREZ, L. Insight into Serum Protein Interactions with Functionalized Magnetic Nanoparticles in Biological Media. **Langmuir**, v. 28, p. 4346-56, 2012.

ARAI, T. E. W. NORDE. The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1. Adsorption from single protein solutions. **Colloids and surfaces**, v. 51, p. 1-15, 2000

BARBOSA, J. A. et al. Crystal structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with beta-trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 5, p. 1638-50, Mar 1 2007. ISSN 1542-0086 (Electronic)

BARBOSA, J. A. et al. Crystal structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with beta-trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 5, p. 1638-50, 2007

BAUTISTA, M. C., Bomati-Miguel, O., P. M. Morales., Serna, C.J. Veintemillas-Verdaguer, S. Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 20-27, 2005.

BARONZIO, G. F.; HAGER, E. D. Hyperthermia in Cancer treatment: A primer. **Springer**. p. 366, 2006.

BERGERS, G., BREKKEN, R., MCMAHON, G., VU, T.H., ITOH, T., TAMAKI, K., TANZAWA, K., THORPE, P., ITOHARA, S., WERB, Z. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 10, p. 737, 2000.

BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soya beans. **Biochemical Journal**, v. 87, n. 2, p. 281, 1963.

Carvalho, A.F., Santos-Neto, M.S., Monteiro, H. S. A., Freitas, S. M., Morhy, L., Nascimento, N. R. F. BTC1 enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. **Brazilian Journal of Biology**, v.

CEGNAR, M., PREMZL, A. ZAVASNIK-BERGANT., V. KRISTL., J.KOS. Poly (Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles as a carrier system for delivering cysteine protease inhibitor cystatin into tumor cells. **Experimental cell research**, v 301, n. 2, p. 223-231, 2004.

CHEN, Y.W., HUANG, S.C., LIN-SHIAU, S.Y., LIN, J.K. Bowman–Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 7, p. 1296-1306, 2005.

CHERTOK, B.; DAVID, A. E.; YANG, V. C. Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration. **Biomaterials**, v. 31, n. 24, p. 6317-6324, 2010.

CORRÊA, D.H.A., RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal Biochem Research**, v.3, n.5, p. 164-173, 2005

DAVIS, M. E. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 9, p. 771-782, 2008.

DEDAVID, B. A; GOMES, C. I; MACHADO, G. Microscopia Eletronica De Varredura: Aplicações E Preparações De Amostras. EDIPUCRS: PORTO ALEGRE. P.60. 2007

DELGADO. A. V., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., HUNTER, R.J., KOOPAL, L. K., LYKLEMA, J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, p. 194–224, 2007.

EROL, M.; DU, H.; SUKHISHVILI, S. Control of specific attachment of proteins by adsorption of polymer layers. **Langmuir**, v. 22, n. 26, p. 11329-11336, 2006.

FACHETTI, H.; MIZUTA, K.; VENTURA, M. Thermodynamics of the association of trypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, n. 3, p. 311-7, 1984.

FRANCO, O. L., SANTOS, R. C., BATISTA, J. A. N., MENDES, A. C. M., ARAUJO, M. A. M., MONNERAT, R. G., GROSSI-DE-SA, M. F., FREITAS, S. M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 3, p. 343-349, 2003.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161-171, 2005.

FIGUEIREDO, L. C. Sistemas magnéticos nanoparticulados à base de maghemita. Universidade de Brasília. Tese de Doutorado, 2009.

FREITAS, S. M.; IKEMOTO, H.; VENTURA, M. M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI). **Journal of protein chemistry**, v. 18, n. 3, p. 307-313, 1999.

GARCIA, M. P., MIRANDA, R. P., CHAVES, S. B., SILVA, L. P., SANTOS, A. D., GUERRERO Z. M. L., MORAIS, C. P., AZEVEDO, R. B. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 277-282, 2005.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações. **Fundação calouste gulbenkian**, 1987.

GUEDES, M. H. A., SADEGUIANIA, N., PEIXOTO, D. L. G., COELHO, J. P., BARBOSA, L. S., AZEVEDO, R. B., KUCKELHAUS, S., SILVA, M. F., MORAIS, P. C., LACAVAL, Z. G. M. Effects Of Ac Magnetic Field And Carboxymethyl-dextran-Coated Magnetite Nanoparticles On Mice Peritoneal Cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 283–286, 2005.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 22-30, 2005.

JOANITTI, G. A.; FREITAS, S. M.; SILVA, L. P. Proteinaceous protease inhibitors: structural features and multiple functional faces. **Current Enzyme Inhibition**, v. 2, n. 3, p. 199-217, 2006.

JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; FREITAS, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Letters**, v. 293, n. 1, p. 73-81, 2010.

JOANITTI, G. A. Efeitos de extrato Bruto de sementes de *Vigna unguiculata* e do inibidor de proteases BTCl, encapsulado em nanopartículas, no tratamento preventivo e terapêutico de câncer de mama e de pele, *in vitro* e *in vivo*. Universidade de Brasília. Tese de doutorado, 2012.

JORDAN, A., SCHOLZ, R., WUST, P., FÄHLING, H., FELIX, R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, n. (1-3), p. 413-419, 1999

JORDAN, A. SCHOLZ, R. MAIER-HAU, K. JOHANNSEN, M. WUST, P. NADOBNY, J. SCHIRRA, H. SCHMIDT, H. DEGER, S. LOENING, S. Presentation of a new magnetic" field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, p. (118-126), 2001.

KALOGERAKOS, K.; SOFOUDIS, C.; BALTAYIANNIS, N. Early breast cancer: a review. **Cancer Therapies**, v. 6, p. 463-476, 2008.

KASZUBA, M., MCKNIGHT, D., CONNAH, M. T., MCNEIL-WATSON, F. K., NOBBMANN, U. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 5, p. 823-829, 2008.

KENNEDY, A. R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. **The American journal of clinical nutrition**, v. 68, n. 6, p. 1406 -1412 , 1998.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LACAVA, Z. G. M., AZEVEDO, R. B., MARTINS, E. V., LACAVA, L. M., FREITAS, M. L. L., GARCIA, V. A. P., REBULA, C. A., LEMOS, A. P. C., SOUSA, M. H., TOURINHO, F. A. Biological Effects Of Magnetic Fluids: Toxicity Studies. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, n. 1, p. 431-434, 1999

LACERDA, S. H. D. P., PARK, J. J., MEUSE, C., PRISTINSKI, D., BECKER, M. L., KARIM, A., DOUGLAS, J.F. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. **American Chemical Society nano**, v. 4, n. 1, p. 365-379, 2009.

LAERA, S., CECCONE, G., ROSSI, F., GILLILAND, D., HUSSAIN, R., SILIGARDI, G., CALZOLAI, L. Measuring Protein Structure and Stability of Protein-Nanoparticle Systems with Synchrotron Radiation Circular Dichroism. **Nano letters**, v. 11, p. 4480-4484, 2011.

LAKOWICZ, J. R.; MASTERS, B. R. Principles of fluorescence spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, p. 029-901, 2008.

LASKOWSKI Jr, M., KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 593-626, 1980.

LEE, I.; SANDY, Y.; SUZUKI, H. Quenching dynamics promoted by silver nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 195, n. 2-3, p. 254-260, 2008.

LIAO, M. H.; CHEN, D. H. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. **Biotechnology letters**, v. 23, n. 20, p. 1723-1727, 2001.

LÓPEZ-OTÍN, C.; MATRISIAN, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 10, p. 800-808, 2007.

LUCAS, I. T., DURAND-VIDAL, S., DUBOIS, E., CHEVALET, J., TURQ, P. D. Surface charge density of maghemite nanoparticles: Role of electrostatics in the proton exchange. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 50, p. 18568-18576, 2007.

MAKHATADZE, G. I.; PRIVALOV, P. L. Energetics of protein structure. **Advances in protein chemistry**, v. 47, p. 307-425, 1995.

MACAROFF, P. P., OLIVEIRA, D. M., LACAVA, Z. G. M., AZEVEDO, R. B., LIMA, E. C. D., MORAIS, P. C., TEDESCO. The effect of bovine serum albumin on the binding constant and stoichiometry of biocompatible magnetic fluids. **Magnetics, IEEE Transactions**, v. 40, n. 4, p. 3027-3029, 2004

MEHTA, R. V., UPADHYAY, R. V., CHARLES, S. W., RAMCHAND, C. N. Direct binding of protein to magnetic particles. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 493-496, 1997.

MILLER, A., HOOGSTRATEN, B., STAQUET, M. WINKLER, What Is Cancer? **Cancer**, v. 47, p. 207-214, 1981.

MORHY, L.; VENTURA, M. M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, n. 1-2, p. 71, 1987.

MOSES, M. A., BREM, H., LANGER, R. Advancing the field of drug delivery: Taking aim at cancer. **Cancer Cell**, v. 4, n. 5, p. 337-341, 2003.

NOËL, A., GILLES, C., BAJOU, K., DEVY, L., KEBERS, F., LEWALLE, J. M., MAQUOI, E., MUNAUT, C., REMACLE, A., FOIDART, J. M. Emerging roles for proteinases in cancer. **Invasion & metastasis**, v. 17, n. 5, 1997.

OLIVEIRA, S. A. Síntese e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo o inibidor de proteinases BTCl e peptídeos derivados. Universidade e Brasília. Instituto de Ciências Biológicas. Dissertação de mestrado, 2012.

OTLEWSKI, J.; KROWARSCH, D.; APOSTOLUK, W. Protein inhibitors of serine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 46, n. 3, p. 531, 1999.

PATIL, S. SANDBERG, A. HECKERT, E. SELF, W. SEAL, S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600-4607, 2007.

PAVON, L. F.; OKAMOTO, O. K. Aplicações de recursos nanobiotecnológicos em câncer. **Revendo ciências básicas**, v.5, n.1, p. 74-75, 2007.

PREDOI, D., ANDRONESCU, E., RADU, M., MUNTEANU, M. C., DINISCHIOTU, A. Synthesis And Characterization Of Bio-Compatible Maghemite Nanoparticles. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n 3, p. 779-786, 2010.

PORFIRE, A.S. TOMUȚA, I. MANUEL, J.IRACHE, S.E.L. The influence of the formulation factors on physico-chemical properties of dextran associated gantrez® an nanoparticles. **Farmacia**, v. 57, p. 463-472, 2009.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096-3102, 1981.

ROTHENBERG, M. L.; CARBONE, D. P.; JOHNSON, D. H. Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 303-309, 2003.

SADEGHIANI, N., BARBOSA, L. S., SILVA, L. P., AZEVEDO, R. B., MORAIS, P. C., LACAVA, Z. G. M. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 289, p. 466-468, 2005. ISSN 0304-8853.

SANTANA, J. F. B., SOLER, M. A. G., DA SILVA, S. W., GUEDES, M. H., LACAVA, Z. G. M., AZEVEDO, R. B., MORAIS, PC. Investigation of the interaction between magnetic nanoparticles surface-coated with carboxymethyl dextran and blood cells using Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 452-454, 2005.

SAOKAR, A. GEE, M.S. ISLAM, T. MUELLER, P.R. HARISINGHANI, M.G. Appearance of primary lymphoid malignancies on lymphotropic nanoparticle-enhanced magnetic resonance imaging using ferumoxtran-10. **Clinical imaging**, v. 34, n. 6, p. 448-452, 2010.

SIU, G. G., CHENG, L. Mie solution of light scattering from spheres of radii up to 80λ with digit-array method. **Josa B**, v. 19, n. 8, p. 1922-1929, 2002.

SOARES, D. Estudo da interação entre porfirinas e eumelaninas sintéticas. Universidade de São Paulo. Instituto de Química. Dissertação de Mestrado, 2005

SILVA, L.P., ROBERTO, S. A. L. J., BLOCH, J. C., FREITAS, S. M. Stability Of A Black Eyed Pea Trypsin Chymotrypsin Inhibitor (BTCl). **Protein and Peptide Letters**, v. 8, n. 1, p. 33-38, 2001.

SOUZA, L. Efeito de um inibidor de serinoprotease em proteossomas de linhagens de células cancerígenas. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) – Universidade de Brasília. 2010

SPERLING, R.; PARAK, W. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1915, p. 1333-1383, 2010

STEIN, C. R. Investigação Magnetoóptica de fluidos magnéticos biocompatíveis a base de maghemita e ferrita de cobalto. Dissertação de Mestrado (Instituto de Química- Universidade de Brasília, 2010.

STORM, FK ELLIOTT, RS HARRISON, WH MORTON, DL. Clinical RF hyperthermia by magnetic-loop induction: A new approach to human cancer therapy. **Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions**, v. 30, n. 8, p. 1149-1158, 1982.

SUN, W. DU, Y. X. CHEN, J. Q. KOU, J. P. YU, B. Y. Interaction between titanium dioxide nanoparticles and human serum albumin revealed by fluorescence spectroscopy in the absence of photoactivation. **Journal of Luminescence**, v. 129, n. 8, p. 778-783, Aug 2009.

TEDESCO, A. C., OLIVEIRA, D. M., LACAVALA, Z. G. M., AZEVEDO, R. B., LIMA, E. C. D., GANSAU, C. BUSKE, N. MORAIS, P. C. Determination of binding constant [bold K] of biocompatible, ferrite-based magnetic fluids to serum albumin. **Journal of applied physics**, v. 93, p. 6704, 2003.

VENTURA, M. M.; XAVIER-FILHO, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vignasinensis*).I. Purification and partial characterization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 553–566, 1966.

VENTURA, M.M; ARAGÃO J. B. The quenching of the tryptophyl fluorescence of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor by iodide and cesium ions – effect of adjacent ionizable groups. **Anais da Academia Brasileira Ciência**, 1997.

VOSS, R.ERMLER, U. ESSEN, L.O. WENZL, G. KIM, Y.M. FLECKER, P. Crystal Structure of the Bifunctional Soybean Bowman-Birk Inhibitor at 0.28-nm Resolution. **European Journal of Biochemistry**, v. 242, n. 1, p. 122-131, 1996.

WANG, Z. ZHAO, J. LI, F. GAO, D. XING, B. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. **Chemosphere**, v. 77, n. 1, p. 67-73, 2009.

WEBER, G. Van't Hoff revisited: enthalpy of association of protein subunits. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 1052-1059, 1995.

WUST, P. HILDEBRANDT, B. SREENIVASA, G. RAU, B. GELLERMANN, J. RIESS, H. FELIX, R. SCHLAG, PM. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **The lancet oncology**, v. 3, n. 8, p. 487-497, 2002.

XU, J. R. SHEN, H, XU, J., LI, X. J., XIONG, XM Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran. **Applied surface science**, v. 252, n. 2, p. 494-500, 2005.

YAVELOW, J. FINLAY, TH KENNEDY, AR TROLL, W. Bowman-Birk Soybean Protease Inhibitor As An Anticarcinogen. **Cancer Research**, v. 43, n. 5, p. 2454s, 1983.

YAVELOW, J. COLLINS, M. BIRK, Y. TROLL, W. KENNEDY, A.R. Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 16, p. 5395, 1985.

YU, H.T. COLUCCI, W.J. MCLAUGHLIN, M.L. BARKLEY, M.D. Fluorescence quenching in indoles by excited-state proton transfer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 22, p. 8449-8454, 1992.

YU, S. E G. M. CHOW "Carboxyl group (-CO₂H) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications." **Journal of Materials. Chemical** v. 14, n. 18, p. 2781-2786, (2004).