BIOSSÍNTESE E APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO REDUZIDAS POR *Herbaspirillum seropedicae*

Caroline Galvão de Faria (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Juliana Inaba, Dhésmon Lima, Patrícia Castellen, Adriano Gonçalves Viana
adrianogviana@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Área de conhecimento: 2.00.00.00-6 Ciências Biológicas, Subárea: 2.08.00.00-2 Bioquímica, 2.08.01.00-9 Química de Macromoléculas

Palavras-chave: Bactérias, biorredução metálica, eletrodos, nanopartículas.

Resumo

A capacidade de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 reduzir o ácido tetracloro áurico ($HAuCl_4$) e formar nanopartículas de ouro (AuNPs) já foi demonstrada por nosso grupo de pesquisa anteriormente. Neste trabalho AuNPs foram bioreduzidas nos pHs 4,50; 5,80; 6,30; 6,80; 7,30 e 7,80, avaliadas por espectroscopia UV-vis e aplicadas como transdutor de sinal em eletrodos de pasta de carbono (EPVC) para a detecção do antitumoral 5-Fluorouracil. A análise foi realizada por impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC). As AuNPs produzidas em pH 6,80 apresentaram melhor desempenho eletroquímico quando comparadas ao eletrodo não modificado e aos eletrodos compostos com AuNPs produzidas nos demais pHs avaliados. O sistema foi utilizado para a detecção do 5-fluorouracil e permitiu uma detecção linear na faixa de $9{,}90 \times 10^{-5}$ a $9{,}09 \times 10^{-4}$.

Introdução

O interesse no desenvolvimento e aplicação dos nanomateriais é devido às suas propriedades físico-químicas, seu tamanho extremamente pequeno e área de superfície elevada (EL-SAYED et al., 2011). A aplicação de AuNPs despertam interesse devido às suas propriedades magnéticas, ópticas, de condutância e de biocompatibilidade. A síntese verde de MNPs baseia-se no desenvolvimento de sistemas que visam reduzir os resíduos tóxicos (ALBRETCH et al., 2006). Métodos utilizando extratos vegetais (IBRAHIM, 2015) e micro-organismos como bactérias (TUGAROVA et al., 2013) são exemplos de agentes redutores para as MNPs. Os sistemas utilizando bactérias são os mais promissores, devido ao fácil cultivo e baixo custo, o que favorece a aplicação biotecnológica. Anteriormente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a β-Proteobactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (BALDANI et al.,1986) possui potencial de biorredução do $HAuCl_4$ com formação de AuNPs. A aplicação de MNPs em sistemas eletroquímicos para melhora da transdução e detecção de analitos, como para a detecção de fármacos nas diferentes formas farmacêuticas vem sendo relatada, pois se trata de uma técnica simples e reprodutível (LIMA, 2016). O fármaco 5-fluorouracil é amplamente utilizado na clínica para tratamento de tumores e o controle de qualidade de fórmulas contendo este fármaco é essencial para garantir a dosagem correta e a eficácia no tratamento dos pacientes. Neste sentido, o desenvolvimento de metodologias eletroquímicas utilizando eletrodos quimicamente modificados por AuNPs procuram a aumentar a sensibilidade e seletividade de detecção de analitos. Neste trabalho foram biosintetizadas AuNPs em diferentes pHs e seu efeito sobre EPVCs para a detecção de 5-fluorouracil foi avaliado.

Materiais e Métodos

Cultivo de H. seropedicae SmR1 e tratamento para a biorredução do $HAuCl_4$

O cultivo ocorreu em meio NFb-malato (KLASSEN et al.,1997) a 30 °C e 120 rpm, durante 3 dias. As células foram centrifugadas à 4000 rpm, e ressolubilizadas em uma solução tampão fosfato pHs 4,5; 5,8; 6,3; 6,8; 7,3 ou 7,8 contendo 1mmol/L $HAuCl_4$. O sistema foi mantido à 30 °C e 120 rpm por 10 dias, sob proteção de luz.

Análise das AuNPs por espectroscopia UV-Vis

Após a biorredução, as células foram lisadas com 0,1% de dodecilsulfato de sódio e 0,2 mol/L de NaOH e analisadas por espectrometria de UV-Vis, em aparelho VarianCary 50Bio, para verificar presença de banda *plasmon* das AuNPs entre 500 a 560 nm (HUANG; EL-SAYED, 2010).

Construção e caracterização dos eletrodos de pasta de carbono vítreo (EPVCs)

Os EPVCs foram preparados a partir de 0,05 g de carbono vítreo, 5 µL de óleo mineral e 10 µL de massa bacteriana contendo ou não (controle) AuNPs. A caracterização eletroquímica ocorreu por VC e EIE em potenciostato AutoLab (PGSTAT 100) em sonda de 5 mmol/L $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$. Foram utilizados no sistema o EPCV como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl como eletrodo referência e contra eletrodo de platina . A VC ocorreu entre 0,3 a 0,8 V e corrente de -120 e 120 µA. A EIE foi realizada para o EPVC não modificado e para o EPVC com AuNPs com melhor desempenho verificado por VC. Os gráficos gerados foram avaliados pelo programa NOVA 2.1.

Curva analítica para determinação de 5-Fluororacil

A curva analítica para a detecção de 5-fluororacil ocorreu em uma célula com 10 mL de tampão PBS como branco, seguida de adições de 100 µL (10 adições de 100 µL) de uma solução inicial de $1x10^{-2}$ mol/L de 5-fluorouracil (Sigma®) intercaladas de leituras de VC, em aparelho µAutolab type III.

Resultados e Discussão

Após a biorredução, as suspensões de *H. seropedicae* SmR1 apresentaram mudança na coloração, de leitosas para tonalidades de violeta ao vermelho, sugerindo a presença de AuNPs de diferentes tamanhos (RAKSHIT, 2017) (figura 1 A). A presença da banda *plasmon* no espectro UV-vis entre 520 a 560 nm (figura 1 B) refere-se à presença de AuNPs (HUANG; EL-SAYED, 2010). sugerindo que a internalização do sal metálico e a redução deste metal independe do pH do meio.

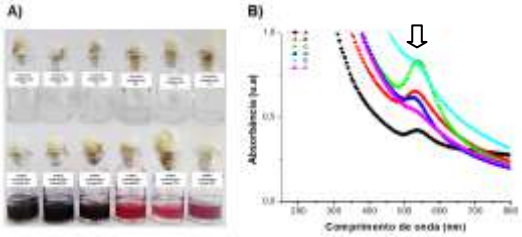


Figura 1. (A) Suspensões de *H. seropedicae* SmR1 na ausência (controles negativos) e na presença de $HAuCl_4$ em diferentes pHs. (B) Espectroscopia UV-VIS. Suspensões incubadas com $HAuCl_4$em tampão fosfato (A) pH 4,5; (B) pH 5,8; (C) pH 6,3; (D) pH 6,8; (E) pH 7,3 e (F) pH 7,8. Banda *plasmon* entre 500- 560 nm (seta).

O efeito das AuNPs em EPVC foram avaliadas via oxirredução da sonda eletroquímica $Fe(CN)_6^{4-} \leftrightarrow Fe(CN)_6^{3-}$. O EPVC com AuNPs formadas em pH 6,8 apresentou maiores valores de corrente entre o pico anódico e catódico para o processo de oxirredução quando comparado aos EPVCs contendo AuNPs formadas em outros pHs (figura 2 A). O cultivo de *H. seropedicae* ocorre em pH 6,8 o que sugere que nesta condição ocorre um menor estresse exterior do que nos demais pHs avaliados, levando a produção de AuNPs mais homogêneas com melhor desempenho eletroquímico. Na figura 2 B observa-se que EPVC não modificado apresenta cinética eletroquímica inferior ao EPVC contendo AuNPs utilizadas como modificador, pois apresenta menores valores de corrente. Os resultados mostram que as AuNPs favorecem a transferência de cargas na superfície do eletrodo. A análise por EIE do EPVC contendo ou não AuNPs (diagramas de Nyquist, figura 2 C) mostram que as AuNPs diminuíram a resistência à transferência de cargas na superfície do eletrodo, devido ao menor semicírculo (BARSUKOV; MACDONALD, 2012; LIMA, 2016), em concordância com os dados de VC.

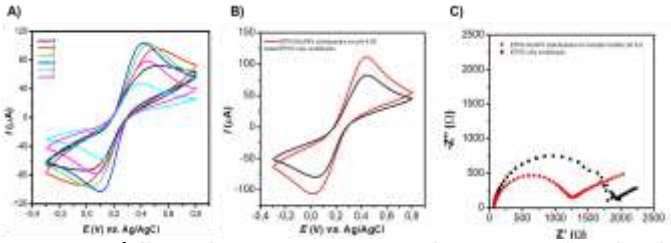


Figura 2. (A) Voltamogramas cíclicos dos EPVCs contendo AuNPs sintetizadas em diferentes pHs. (B) Voltamogramas cíclicos e (C) espectro de impedância eletroquímica- diagramas de Nyquist- de EPVC não modificado e EPVC contendo AuNPs.

EPVC contendo AuNPs biossintetizadas em pH 6,8 foram utilizados para a detecção do 5-fluorouracil por VC. O voltamograma mostra o processo redox do 5-fluororacil (figura 3 A), onde nota-se que adições sucessivas deste fármaco ao sistema leva à um aumento da resposta eletroquímica do EPVC. As concentrações avaliadas foram de $9{,}90 \times 10^{-5}$ a $9{,}09 \times 10^{-4}$.

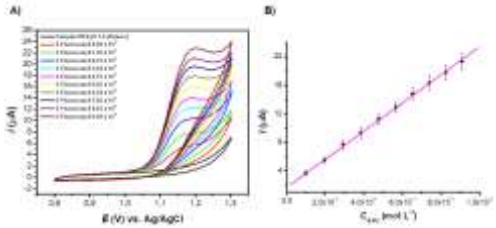


Figura 3. (A) Voltamogramas cíclicos das diferentes concentrações de 5-Fluorouracil adicionadas à célula eletroquímica contendo tampão BPS como branco. (B) Curva analítica de detecção do fármaco 5-Fluoracil pelo EPVC contendo AuNPs sintetizadas em pH 6,8.

A curva analítica do 5-Fluorouracil (figura 3 B) apresentou um coeficiente de correlação de 0,99975, indicando que o método avaliado apresenta linearidade e pode ser utilizado para detectar este fármaco nas concentrações avaliadas.

Conclusões

H. seropedicae SmR1 se mostrou um bom agente biológico para a síntese de AuNPs e que o pH exerce efeito sobre sua formação. O EPVC contendo AuNPs biossintetizadas em pH 6,80 apresentou bom desempenho como modificador em

sistema eletroquímico. O biosensor produzido foi capaz de detectar o fármaco 5-fluorouracil até a concentração de $1x10^{-5}$ mol/L, sendo uma opção de metodologia para o controle de qualidade de medicamentos contendo este fármaco.

Agradecimentos

A Fundação araucária pelo financiamento, ao Laboratório de biologia molecular microbiana da UEPG (LABMOM), grupo de desenvolvimento de eletrodos modificados da UEPG (GDEM) e ao grupo de fixação de nitrogênio da UFPR.

Referências

ALBRECHT, M. A.., EVANS, C. W., RASTON, C. L. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. **Green Chemistry**, v. 8., p. 417-432, 2006.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. V. 36. P. 86-93. 1986.

BARSUKOV, Y.; MACDONALD, J. R. Electrochemical impedance spectroscopy. **Characterization of materials**, v. 2, p. 898-913, 2012.

EL-SAYED, M.A. Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes. **Acc. Chem. Res**., v. 34, p. 257–264, 2011.

HUANG, X., & EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**. 1, 13–28. 2010.

IBRAHIM, H. MM. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 3, p. 265-275, 2015.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen in Herbaspirillum seropedicae SMR1. **Can. J. Microbiol**. v. 43, p. 887-891, 1997.

LIMA, D. et al. **Eletrodos de pasta de carbono vítreo modificados com nanopartículas de ouro estabilizadas em porfirana: potenciais aplicações para a detecção do agente antitumoral 5-fluorouracil.** 2016.

RAKSHIT, S.; MOULIK, S. P.; BHATTACHARYA, S. C. Understanding the effect of size and shape of gold nanomaterials on nanometal surface energy transfer. **Journal of colloid and interface science**, v. 491, p. 349-357, 2017.

TUGAROVA, A. V. et al. Gold (III) reduction by the rhizobacterium Azospirillum brasilense with the formation of gold nanoparticles. **Microbial ecology**, v. 67, n. 1, p. 155-160, 2014.