

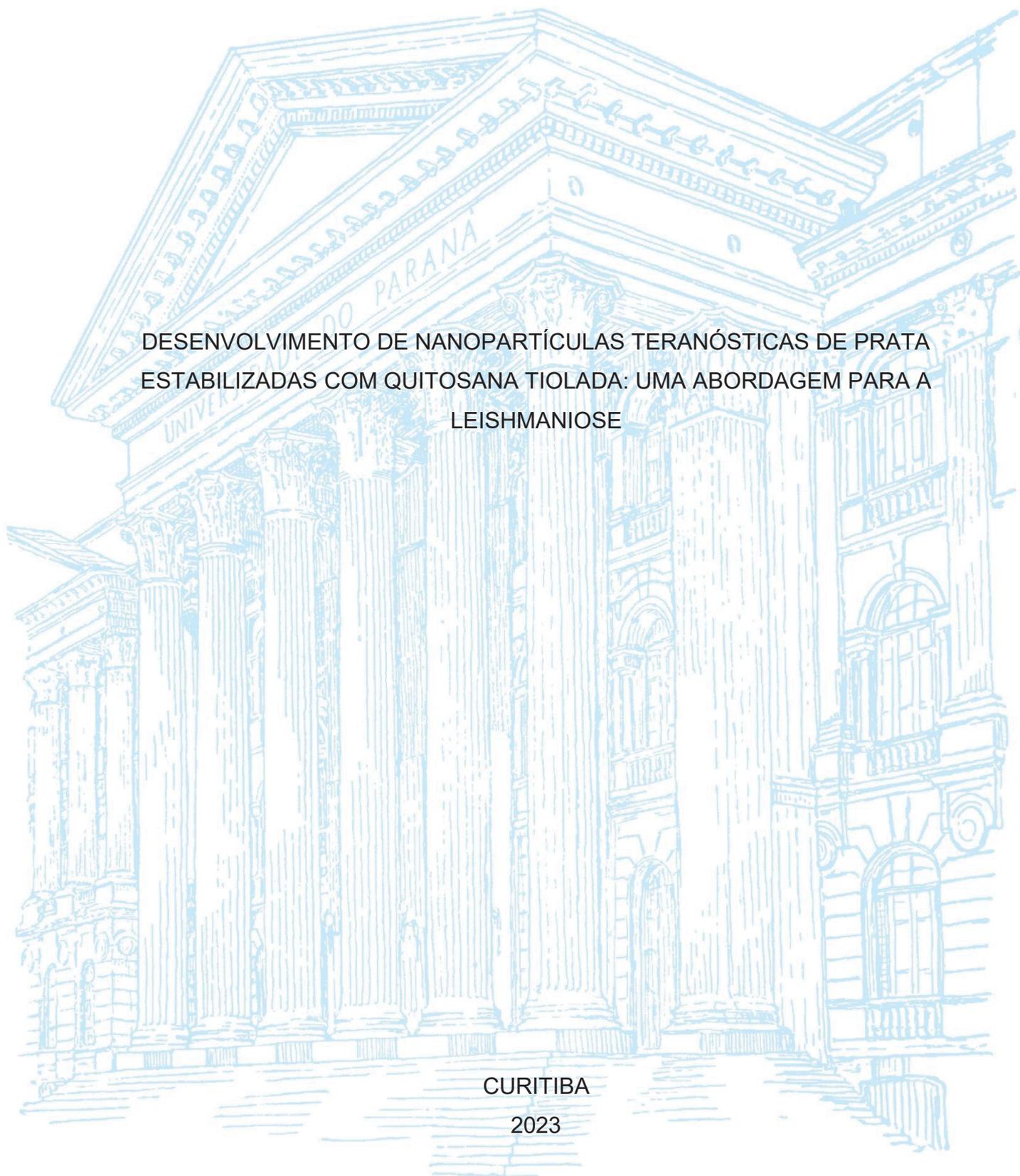
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA PEREIRA PARCHEN

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS TERANÓSTICAS DE PRATA
ESTABILIZADAS COM QUITOSANA TIOLADA: UMA ABORDAGEM PARA A
LEISHMANIOSE

CURITIBA

2023



GABRIELA PEREIRA PARCHEN

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS TERANÓSTICAS DE PRATA
ESTABILIZADAS COM QUITOSANA TIOLADA: UMA ABORDAGEM PARA A
LEISHMANIOSE

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

Coorientadores: Prof. Dr. Dênio Emanuel Pires Souto
Prof. Dr. Hervé Hillaireau

CURITIBA

2023

Parchen, Gabriela Pereira

Desenvolvimento de nanopartículas teranósticas de prata estabilizadas com quitosana tiolada [recurso eletrônico]: uma abordagem para a leishmaniose / Gabriela Pereira Parchen – Curitiba, 2023.

1 recurso online : PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

Coorientadores: Prof. Dr. Dênio Emanuel Pires Souto
Prof. Dr. Hervé Hillaireau

1. Quitosana. 2. Nanopartículas metálicas. 3. Leishmaniose visceral. 4. Testes imunológicos. I. Freitas, Rilton Alves. II. Souto, Dênio Emanuel Pires. III. Hillaireau, Hervé. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.1901



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GABRIELA PEREIRA PARCHEN** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS TERANÓSTICAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM QUITOSANA TIOLADA: UMA ABORDAGEM PARA A LEISHMANIOSE**, sob orientação do Prof. Dr. RILTON ALVES DE FREITAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Setembro de 2023.

RILTON ALVES DE FREITAS
Presidente da Banca Examinadora

MARIA ALICE WITT
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

JULIANA FERREIRA DE MOURA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

LUANA MOTA FERREIRA
Avaliador Externo (40001016)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, em especial aos laboratórios BioPol, LAESB e Laboratório de Biologia Molecular, pela estrutura e facilidades disponibilizadas ao longo destes anos de graduação, mestrado e doutorado.

Às agências de fomento pelo auxílio financeiro extremamente necessário e principalmente à CAPES, pelo fomento tanto no Brasil quanto na França.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas, pela orientação desde o mestrado e contribuições científicas essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Dênio Emanuel Pires Souto, pela coorientação, paciência e disponibilidade de ajuda desde o início com o trabalho.

Ao Prof. Dr. Hervé Hillaireau, pelo acolhimento no exterior e contribuição nas discussões científicas.

À banca da qualificação formada pelas Profas. Dra. Juliana Ferreira de Moura e Dra. Maria Alice Witt pelas contribuições científicas e discussões extremamente pertinentes.

À banca da defesa composta pelas Profas. Dra. Juliana Ferreira de Moura, Dra. Luana Mota Ferreira e Dra. Maria Alice Witt, pelas discussões científicas e sugestões de melhoria da tese.

À Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol pela disponibilidade de colaboração e desenvolvimento da parte biológica deste trabalho.

À Msc. Jaqueline Volpe, toda minha gratidão pelo auxílio nos experimentos e interpretação dos dados, pelas risadas, pela empatia e pela disponibilidade, mesmo ocupada.

Ao Dr. Manuel Hospinal-Santiani pelos experimentos de cultivo celular e paciência em responder todas as minhas perguntas diárias.

À Université Paris-Saclay, pela estrutura e pelo acolhimento.

Aos amigos do BioPol, LAQMA e LAESB, pelo companheirismo, amizade e ajudas nos experimentos.

Aos que colaboraram diretamente ou indiretamente com este trabalho.

Sei que podia ser bem menos complicado,
mas se não fosse complicado
talvez eu nem estivesse aqui pra ver o que isso iria ser.
(JOSÉ TIAGO SABINO PEREIRA, 2017)

RESUMO

A leishmaniose visceral faz parte da lista da Organização Mundial de Saúde (OMS) de seis doenças endêmicas prioritárias no mundo. O tratamento desta doença apresenta alta toxicidade e baixa adesão pelos pacientes, já o diagnóstico é realizado pela identificação dos parasitas ou por exames moleculares. Os testes imunológicos têm sido desenvolvidos para facilitar e acelerar a identificação, principalmente devido à rápida evolução da doença. Neste sentido, nanopartículas metálicas têm sido exploradas como sondas para detectar analitos. Embora suas propriedades ópticas sejam excelentes, estas partículas podem se aglomerar, o que poderia ser evitado com o capeamento com biopolímeros, aumentando sua estabilidade e possibilitando seu uso como parte de biossensores. A quitosana, uma macromolécula semissintética, se destaca na área de liberação de substâncias ativas e como agente estabilizador de nanopartículas metálicas. A introdução de grupos sulfidril na quitosana leva à formação de ligações dissulfeto, que apresentam boa capacidade de ligação com partículas metálicas. A quitosana já é estudada como agente estabilizante de nanopartículas de prata para detecção de analitos, porém, a quitosana tiolada (TCh) ainda não é bem descrita neste campo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi utilizar a TCh para estabilizar nanopartículas de prata (AgNPs) e depositar anticorpos na sua superfície, e dessa forma desenvolver nanoestruturas que sejam capazes de diagnosticar e tratar simultaneamente a leishmaniose. Para isso, a TCh foi sintetizada a partir do acoplamento do ácido-3-mercaptopropiônico com a quitosana, em uma reação mediada por hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida/N-hidroxissuccinimida (EDC/NHS) e posteriormente caracterizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ^1H e ^{13}C) e espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR). Além disso, a presença dos grupamentos sulfidril na estrutura do polímero foi confirmada pelo Ensaio de Ellman. A estabilização das nanopartículas de prata com TCh (TCh-AgNPs) foi realizada pelo método de redução química com borohidreto de sódio. As AgNPs apresentaram diâmetro médio de 29 ± 2 nm e comprimento de onda do máximo de absorção (λ_{max}) médio de 391 ± 2 nm, já as TCh-AgNPs apresentaram diâmetro médio de 66 ± 1 nm e λ_{max} médio de 418 ± 2 nm. Após o desenvolvimento e caracterização das TCh-AgNPs, anticorpos anti-rK39 foram ligados à superfície das nanopartículas (TCh-AgNPs@Ac) em uma reação mediada por EDC/NHS. Essas partículas formadas foram avaliadas em relação ao seu potencial imunodiagnóstico. Um biossensor baseado na técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) foi construído através da ligação covalente da proteína rK39 sobre o substrato de ouro previamente funcionalizado, e foi observado o potencial de ligação da rK39 com as TCh-AgNPs@Ac e com o anticorpo livre. A partir desse estudo foi observado o favorecimento da cinética da reação e maior detectabilidade pelas TCh-AgNPs@Ac. Adicionalmente, as TCh-AgNPs e as TCh-AgNPs@Ac foram testadas contra formas promastigotas de *Leishmania*, as quais obtiveram uma taxa de mortalidade de $79,02 \pm 3,5\%$ e $87,66 \pm 13,5\%$, respectivamente, o que indica uma boa ação leishmanicida. Testes de segurança também foram realizados, como a avaliação da citotoxicidade em macrófagos e o ensaio cometa em linfócitos. Com os dados obtidos, as partículas demonstraram alto potencial de diagnóstico, e boa atividade leishmanicida.

Palavras-chave: quitosana tiolada; nanopartículas metálicas; teranóstico; leishmaniose visceral; testes imunológicos.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is part of the World Health Organization's (WHO) list of six priority endemic diseases worldwide. The treatment of this disease is highly toxic and has low patient adherence, while diagnosis is performed through the identification of parasites or molecular tests. Immunological tests have been developed to facilitate and accelerate the identification, primarily due to the rapid progression of the disease. In this regard, metallic nanoparticles have been explored as probes to detect analytes. Although their optical properties are excellent, these particles can aggregate, which could be prevented by capping them with biopolymers, increasing their stability and enabling their use as part of biosensors. Chitosan, a semi-synthetic macromolecule, stands out in the field of active substance release and as a stabilizing agent for metallic nanoparticles. The introduction of thiol groups into chitosan leads to the formation of disulfide bonds, which have a good binding capacity with metallic particles. Chitosan is already studied as a stabilizing agent for silver nanoparticles for analyte detection, but thiolated chitosan (TCh) is not well described in this field. Therefore, the aim of this work was to use TCh to stabilize silver nanoparticles (AgNPs) and deposit antibodies on their surface, thereby developing nanostructures capable of simultaneously diagnosing and treating leishmaniasis. To pursue this, TCh was synthesized by coupling 3-mercaptopropionic acid with chitosan in a reaction mediated by N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) hydrochloride, and subsequently characterized by hydrogen and carbon nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR) and vibrational spectroscopy in the infrared region (FTIR). In addition, the presence of thiol groups in the polymer structure was confirmed by Ellman's assay. The stabilization of silver nanoparticles with TCh (TCh-AgNPs) was carried out by the chemical reduction method using sodium borohydride. The AgNPs had an average diameter of 29 ± 2 nm and a mean maximum absorption wavelength (λ_{max}) of 391 ± 2 nm, while the TCh-AgNPs had an average diameter of 66 ± 1 nm and a mean λ_{max} of 418 ± 2 nm. After the development and characterization of TCh-AgNPs, anti-rK39 antibodies were attached to the surface of the nanoparticles (TCh-AgNPs@Ab) in a reaction mediated by EDC/NHS. These formed particles were evaluated regarding their immunodiagnostic potential. A biosensor based on surface plasmon resonance (SPR) technique was constructed by covalently binding the rK39 protein onto a previously functionalized gold substrate, and the binding potential of rK39 with TCh-AgNPs@Ab and free antibodies was observed. From this study, it was observed that the kinetics of the reaction were favored, and higher detectability was achieved with TCh-AgNPs@Ab. Additionally, TCh-AgNPs and TCh-AgNPs@Ab were tested against *Leishmania* promastigotes, resulting in a mortality rate of $79.02 \pm 3.5\%$ and $87.66 \pm 13.5\%$, respectively, indicating good leishmanicidal action. Safety tests were also conducted, such as cytotoxicity assessment in macrophages and the comet assay in lymphocytes. Based on the data obtained, the particles demonstrated a high diagnostic potential and good leishmanicidal activity.

Keywords: thiolated chitosan; metallic nanoparticles; theranostics; visceral leishmaniasis; immunological tests.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO PARASITA <i>Leishmania sp.</i>	20
FIGURA 2 – FUNCIONAMENTO DA TÉCNICA DE DETECÇÃO POR SPR NA CONFIGURAÇÃO DE KRETSCHMANN	25
FIGURA 3 – ESQUEMA DESCRITIVO DAS ETAPAS DE DETECÇÃO DE ANALITOS NO SENSOR SPR. NESTE EXEMPLO, A IMOBILIZAÇÃO DE UMA BIOMOLÉCULA (COMO POR EXEMPLO, UMA PROTEÍNA) OCORRE SOBRE O SUBSTRATO DE OURO E HÁ A INTERAÇÃO DO ANALITO (POR EXEMPLO, UM ANTICORPO).	26
FIGURA 4 – (A) ESTRUTURA DO ANTICORPO: DUAS CADEIAS PESADAS (FRAGMENTOS F_c) E DUAS CADEIAS LEVES CADEIAS (FRAGMENTOS F_{ab}) LIGADAS POR LIGAÇÕES DISSULFETO. (B) ORIENTAÇÕES DO ANTICORPO SOBRE UM SUBSTRATO, DESTACANDO A FORMA CORRETA DE ORIENTAÇÃO COM AS PORÇÕES F_{ab} LIVRES PARA A CAPTURA DO ANTÍGENO (DESTACADA EM LARANJA).....	28
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA, ONDE Y: SUBUNIDADE DE β -D-N-ACETILGLUCOSAMINA E X: SUBUNIDADE DE β -D-GLUCOSAMINA	32
FIGURA 6 – REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA COM ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO (3-MPA) MEDIADA POR EDC/NHS PARA A OBTENÇÃO DA QUITOSANA TIOLADA (TCh).....	37
FIGURA 7 – ESQUEMA DE REAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS TCh-AgNPs PELA METODOLOGIA M1	41
FIGURA 8 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS TCh-AgNPs PELA METODOLOGIA M2	41
FIGURA 9 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS TCh-AgNPs PELA METODOLOGIA M3	41
FIGURA 10 - ESQUEMA DE MODIFICAÇÃO DO DISCO DE VIDRO RECOBERTO COM OURO PARA CARACTERIZAR AS ETAPAS DE SÍNTESE DAS TCh-AgNPs@Ac. MODIFICAÇÃO DO OURO COM 11-MUA, ATIVAÇÃO DOS GRUPAMENTOS ÁCIDOS DA SUPERFÍCIE COM	

	EDC/NHS, SEGUIDO DA LIGAÇÃO DAS TCh-AgNPs E A LIGAÇÃO DO ANTI-rK39.....	44
FIGURA 11	– ESQUEMA DE MODIFICAÇÃO DOS (A) DISCOS DE VIDRO RECOBERTO COM OURO E (B) CRISTAIS DE QUARTZO RECOBERTOS COM OURO PARA RECEBER A PROTEÍNA rK39.	46
FIGURA 12	– ESQUEMA DE DETECÇÃO DO ANTICORPO ANTI-rK39 E DAS TCh-AgNPs@Ac PELA METODOLOGIA DE (A) SPR E (B) QCM.....	48
FIGURA 13	- ESQUEMA DE MODIFICAÇÃO DO DISCO DE VIDRO RECOBERTO COM OURO PARA IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA rK39. MODIFICAÇÃO DO OURO COM 11-MUA, ATIVAÇÃO DOS GRUPAMENTOS ÁCIDOS DA SUPERFÍCIE COM EDC/NHS, SEGUIDO DA LIGAÇÃO DAS TCh-AgNPs E A LIGAÇÃO DO ANTI-rK39, SEGUIDO DA ETAPA DE BLOQUEIO COM EA	49
FIGURA 14	– ESPECTRO DE RMN DE HIDROGÊNIO (RMN ¹ H) PARA (A) QUITOSANA BRUTA E (B) PURIFICADA COM DOIS CICLOS DE PURIFICAÇÃO EM D ₂ O E ÁCIDO ACÉTICO DEUTERADO (100:2 v v ⁻¹), A 70 °C, 400 MHz. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)	56
FIGURA 15	- PRIMEIRA DERIVADA (dpH/dV) CALCULADA A PARTIR DA TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA QUITOSANA PURIFICADA COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,1 mol L ⁻¹	57
FIGURA 16	– ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA A QUITOSANA BRUTA E QUITOSANA PURIFICADA COM UM (1ª PURIFICAÇÃO) E DOIS (2ª PURIFICAÇÃO) CICLOS DE PURIFICAÇÃO	59
FIGURA 17	– PERFIL DE ELUIÇÃO DA QUITOSANA PURIFICADA ATRAVÉS DE UMA COLUNA SHODEX OHPACK SB-806M HQ USANDO OS DETECTORES RALS, LALS E RI. TAMPÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 M (pH 4,6) E 0,02% (m v ⁻¹) NaN ₃ COMO FASE MÓVEL, A 0,4 mL min ⁻¹ A 40 °C.....	60
FIGURA 18	– CURVA ANALÍTICA DE CISTEÍNA-L- CLORIDRATO QUANTIFICADA PELO ENSAIO DE ELLMAN. ABSORBÂNCIA MEDIDA NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 412 nm	62

FIGURA 19 – CINÉTICA DE REDUÇÃO DAS LIGAÇÕES DISSULFETO PRESENTES NA QUITOSANA TIOLADA	63
FIGURA 20 – ESPECTRO DE RMN DE HIDROGÊNIO (RMN ¹ H) RESOLVIDO PARA QUITOSANA TIOLADA EM D ₂ O, A 70 °C, 400 MHz. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM (δ).....	64
FIGURA 21 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA A QUITOSANA PURIFICADA E A QUITOSANA TIOLADA (TCh).....	65
FIGURA 22 – SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{SPR}$ VS. TEMPO) OBTIDO PARA O PROCESSO DE LIGAÇÃO DA TCh (0,5 mg mL ⁻¹ , EM ÁGUA) SOBRE O DISCO DE SPR LIMPO. AS LINHAS CINZA REPRESENTAM AS ETAPAS DE LAVAGEM E A LINHA LARANJA REPRESENTA A ETAPA DE LIGAÇÃO DO POLÍMERO	67
FIGURA 23 – ASPECTO MACROSCÓPICO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE DE REDUÇÃO QUÍMICA COM RAZÃO MOLAR DE NaBH ₄ /AgNO ₃ DE 1, 2, 5, 10, 15 E 20, OBSERVADAS ATÉ 72h APÓS A SÍNTESE	68
FIGURA 24 - ASPECTO MACROSCÓPICO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TCh (0,00 a 1,00 mg mL ⁻¹) PRODUZIDAS PELAS METODOLOGIAS M1, M2 E M3, OBSERVADAS ATÉ 48h	72
FIGURA 25 - COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DO ESPECTRO DE VARREDURA (λ_{max}) NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TCh (0,00 a 1,00 mg mL ⁻¹) PRODUZIDAS PELAS METODOLOGIAS M1, M2 E M3	73
FIGURA 26 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TCh (0,00 a 1,00 mg mL ⁻¹) PRODUZIDAS PELAS METODOLOGIAS M1, M2 E M3	74
FIGURA 27 – POTENCIAL ζ DAS DISPERSÕES COLOIDAIS DAS TCh-AgNPs OBTIDAS PELAS METODOLOGIAS M2 E M3.....	75
FIGURA 28 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS TCh-AgNPs COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TCh PELA TÉCNICA DE NTA	77

FIGURA 29 - POTENCIAL ζ DAS TCh-AgNPs ANTES DA ULTRACENTRIFUGAÇÃO E DEPOIS DA RESSUSPENSÃO	78
FIGURA 30 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA O AgNO ₃ , QUITOSANA TIOLADA (TCh) E TCh-AgNPs EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	79
FIGURA 31 - DISPERSÕES COLOIDAIS DE TCh-AgNPs COM 0.5 mg mL ⁻¹ DE TCh EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.....	80
FIGURA 32 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ζ DAS TCh-AgNPs COM 0,5 mg mL ⁻¹ DE TCh EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.....	80
FIGURA 33 - COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DO ESPECTRO DE VARREDURA (λ_{max}) DAS TCh-AgNPs COM 0,50 mg mL ⁻¹ DE TCh EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA	81
FIGURA 34 – ESQUEMA DE REAÇÃO OTIMIZADA PARA A SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA CAPEADAS COM QUITOSANA TIOLADA	82
FIGURA 35 - CURVA ANALÍTICA DO TROLOX OBTIDA PELO ENSAIO DE ABTS COM CONCENTRAÇÕES ENTRE 6,35 E 75 mmol L ⁻¹ . ABSORBÂNCIA MEDIDA NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 734 nm	83
FIGURA 36 – PORCENTAGEM DE ESTABILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTENDO RADICAL ABTS [•]	84
FIGURA 37 - SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{SPR}$ VS. TEMPO) OBTIDO PARA O PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DO CHIP SENSOR DE SPR COM 11-MUA, ATIVAÇÃO COM EDC/NHS, IMOBILIZAÇÃO DAS TCh-AgNPs, ATIVAÇÃO COM EDC/NHS E IMOBILIZAÇÃO DO ANTI-rK39 (20 μ g mL ⁻¹) NA SUPERFÍCIE DA PARTÍCULA.....	86
FIGURA 38 – CURVA DE REFLECTÂNCIA DAS ETAPAS DE SÍNTESE DAS TCh-AgNPs SOBRE O SENSOR DE SPR.....	87
FIGURA 39 – PADRÕES DE MIGRAÇÃO OBTIDOS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) COM DODECILSULFATO DE SÓDIO (SDS) PARA AMOSTRAS DE TCh (0,5 mol L ⁻¹ , EM ÁGUA), TCh-AgNPs@Ac CONTENDO O ANTICORPO NA CONCENTRAÇÃO DE 20 μ g mL ⁻¹ E A SOLUÇÃO DE ANTICORPO (20 μ g mL ⁻¹), COMPARADOS COM O LADDER.....	88

FIGURA 40 – MEDIDAS DO ÂNGULO DE CONTATO ENTRE A ÁGUA E O AR MEDIDOS SOBRE OS APARATOS DE QCM E SPR FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO 11-MUA, ATIVADOS VIA EDC/NHS, ANCORADOS COM A PROTEÍNA rK39 E BLOQUEADOS COM ETANOLAMINA	90
FIGURA 41 - SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO) OBTIDO PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 SOBRE CHIP SENSOR DE SPR, FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO 11-MUA (1 mmol L ⁻¹) E ATIVADO VIA NHS-EDC (150:100 mmol L ⁻¹).....	91
FIGURA 42 - CURVA DE REFLECTÂNCIA PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 SOBRE CHIP SENSOR DE SPR, FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO 11-MUA (1 mmol L ⁻¹) E ATIVADO VIA NHS-EDC (150:100 mmol L ⁻¹)	92
FIGURA 43 - SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO DE REAÇÃO) EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS A INTERAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 ANCORADA NO CHIP SENSOR DE SPR COM ANTICORPO ANTI-rK39 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	93
FIGURA 44 - SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO DE REAÇÃO) EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS A INTERAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 ANCORADA NO CHIP SENSOR DE SPR COM AS TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	94
FIGURA 45 - RELAÇÃO LINEAR ENTRE A CONCENTRAÇÃO DO ANTI-rK39 E DAS TCh-AgNPs@Ac E A $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ EFETIVA PARA OS RESULTADOS EVIDENCIADOS NA DETECÇÃO DA PROTEÍNA rK39	95
FIGURA 46 - CURVAS DE SPR AJUSTADAS GLOBALMENTE A PARTIR DO SOFTWARE DE INTERAÇÃO BIOMOLECULAR TRACE DRAWER, VERSÃO 1.5. (A) AJUSTE OBTIDO A PARTIR DAS CURVAS DE SPR PARA A INTERAÇÃO ENTRE O ANTICORPO LIVRE (ANTI-rK39) E O ANTÍGENO rK39 E (B) AJUSTE OBTIDO A PARTIR DAS CURVAS DE SPR PARA A INTERAÇÃO ENTRE O ANTICORPO CONJUGADO (TCh-AgNPs@Ac) E O ANTÍGENO rK39.....	96

FIGURA 47 – RESPOSTA OBTIDA POR QCM EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS A INTERAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 ANCORADA NO CRISTAL DE QCM COM O ANTICORPO LIVRE E AS TCh-AgNPs@Ac NAS CONCENTRAÇÕES DE (A) 10 E (B) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	98
FIGURA 48 – SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO DE REAÇÃO) EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS A INTERAÇÃO DAS TCh-AgNPs@Ac ANCORADAS NO CHIP SENSOR DE SPR COM O SORO CONTENDO PROTEÍNA rK39 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	100
FIGURA 49 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE HEMÁCIAS TRATADAS COM TCh, AgNPs, TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ A 0,2 ng mL^{-1})	101
FIGURA 50 - AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DESNATURAÇÃO DA OXIHEMOGLOBINA EM HEMÁCIAS TRATADAS COM TCh, AgNPs, TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ A 0,2 ng mL^{-1})	102
FIGURA 51 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM TCh, AgNPs, TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ A 0,2 ng mL^{-1}), AVALIADOS PELO REAGENTE MTT.....	103
FIGURA 52 – ACHADOS MICROSCÓPICOS DO EXPERIMENTO DE ENSAIO COMETA. AS CÉLULAS PRESENTES NAS IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA FORAM USADAS COMO BASE PARA CLASSIFICAR OS GRAUS DE DANO NO DNA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM AS PARTÍCULAS E/OU AMBISSOME® OU MACRÓFAGOS SEM TRATAMENTO (USADO COMO CONTROLE NEGATIVO).	104
FIGURA 53 - IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE MACRÓFAGOS (A) SAUDÁVEIS EM FASE DE MITOSE, (B) CONTAMINADOS COM LEISHMANIA EM BAIXA TAXA DE INFECÇÃO, (C) COM AUMENTO DA TAXA DE CONTAMINAÇÃO POR LEISHMANIA, (D) COM ALTAS TAXAS DE INFECÇÃO, (E) COM DETERIORIZAÇÃO DA MORFOLOGIA CAUSADA PELA INFECÇÃO E (F) EM LISE CELULAR	110

FIGURA 54 – PORCENTAGEM DE CÉLULAS INFECTADAS CONTADAS A PARTIR AS MICROGRAFIAS OBTIDAS DE MACRÓFAGOS CONTAMINADOS COM FORMAS AMASTIGOTAS E TRATADOS COM TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	111
FIGURA 55 – IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE MACRÓFAGOS CONTAMINADOS COM FORMAS AMASTIGOTAS E TRATADOS COM TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VOLUMES DOS COMPONENTES DAS FORMULAÇÕES DE AgNPs	40
TABELA 2 – VOLUMES E CONCENTRAÇÕES FINAIS DOS COMPONENTES DAS FORMULAÇÕES DE TCh-AgNPs.....	40
TABELA 3 – DILUIÇÃO DO SORO HUMANO MANUALMENTE CONTAMINADO COM A PROTEÍNA rK39 E A RESPECTIVA CONCENTRAÇÃO FINAL DA PROTEÍNA rK39	49
TABELA 4 – ATRIBUIÇÕES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS ANÁLISES DE RMN DE HIDROGÊNIO (RMN ¹ H) DA QUITOSANA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ).....	56
TABELA 5 - ATRIBUIÇÕES DE BANDAS DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA A QUITOSANA BRUTA E QUITOSANA PURIFICADA COM UM (1ª PURIFICAÇÃO) E DOIS (2ª PURIFICAÇÃO) CICLOS DE PURIFICAÇÃO	58
TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA QUITOSANA PURIFICADA	61
TABELA 7 - ATRIBUIÇÕES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS ANÁLISES DE RMN DE HIDROGÊNIO (RMN ¹ H) DA TCh. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ).....	65
TABELA 8 – ATRIBUIÇÃO DE BANDAS DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA A QUITOSANA PURIFICADA E PARA A QUITOSANA TIOLADA	66
TABELA 9 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE DE REDUÇÃO QUÍMICA COM RAZÃO MOLAR DE NABH ₄ /AgNO ₃ DE 1, 2, 5, 10, 15 E 20, OBSERVADAS ATÉ 72h.....	69
TABELA 10 - COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DO ESPECTRO DE VARREDURA (λ _{max}) (nm) DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE DE REDUÇÃO QUÍMICA COM RAZÃO MOLAR DE NABH ₄ /AgNO ₃ DE 1, 2, 5, 10, 15 E 20, OBSERVADAS ATÉ 72h.....	69
TABELA 11 – POTENCIAL ZETA (POTENCIAL ζ) DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE DE REDUÇÃO QUÍMICA COM	

RAZÃO MOLAR DE $\text{NABH}_4/\text{AgNO}_3$ DE 1, 2, 5, 10, 15 E 20, OBSERVADAS ATÉ 72H. AS AMOSTRAS FORAM DILUÍDAS EM SOLUÇÃO DE KCl (1 mmol L^{-1}).....	70
TABELA 12 – MEDIDAS DE TAMANHO DAS TCh-AgNPs OBTIDAS POR DLS E NTA	76
TABELA 13 – CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS POR mL OBTIDA PELA TÉCNICA DE NTA	76
TABELA 14 – QUANTIFICAÇÃO DE GRUPOS SH NO SOBRENADANTE APÓS A ULTRACENTRIFUGAÇÃO DAS TCh-AgNPs	78
TABELA 15 - NÚMERO DE ANTICORPOS ANTI-Rk39 POR NANOPARTÍCULA DE TCh-AgNP@Ac.....	89
TABELA 16 – PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS k_a = CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO CINÉTICA E k_d = CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO CINÉTICA OBTIDAS DA INTERAÇÃO DA rk39 COM O ANTICORPO NA FORMA LIVRE (Anti-rK39 - rK39) E COM ANTICORPO NA FORMA CONJUGADA (TCh-AgNPs@Ac – rK39)	97
TABELA 17 – FREQUÊNCIA DO GRAU DE DANO AO DNA EM LINFÓCITOS USANDO ENSAIO COMETA	105
TABELA 18 – ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DAS TCh-AgNPs PARA FORMAS PROMASTIGOTAS EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	107
TABELA 19 – ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA E VALORES DE CC_{50} DAS TCh-AgNPs PARA FORMAS PROMASTIGOTAS EM FUNÇÃO DO TEMPO	108
TABELA 20 – ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA E VALORES DE CC_{50} DA TCh, AgNPs, TCh-AgNPs e TCh-AgNPs@Ac PARA FORMAS PROMASTIGOTAS	109

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

%GD	- Grau de desacetilação
11-MUA	- Ácido 11-mercaptoundecanóico
λ_{\max}	- Comprimento de onda do máximo de absorção
ABTS	- Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
AgNPs	- Nanopartículas de prata
APCs	- <i>Antigen-presenting cells</i> (Células apresentadoras de antígeno)
ATR	- <i>Attenuated total reflection</i> (Reflectância total atenuada)
CD ₃ COOD	- Ácido acético deuterado
CI ₅₀	- Concentração inibitória média
D ₂ O	- Água deuterada
DLS	- <i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento dinâmico de luz)
DTNB	- Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTNs	- Doenças tropicais negligenciadas
EA	- Etanolamina
EDC	- Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima)
ERNs	- Espécies reativas de nitrogênio
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
F _{ab}	- Fragmento de ligação ao antígeno
F _c	- Fragmento cristalizável
FTIR	- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho
GSH	- Glutathiona
IFN- γ	- Interferon- γ
IL-12	- Interleucina-12
IS	- Índice de seletividade
LC	- Leishmaniose cutânea
LM	- Leishmaniose mucocutânea
LOD	- Limite de detecção
LOQ	- Limite de quantificação
LSP	- Plásmons de superfície localizados

LV	- Leishmaniose visceral
MPA	- Ácido 3-mercaptopropiônico
MTT	- 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NHS	- N-hidroxissuccinimida
NO	- <i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NTA	- <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (Análise de rastreamento de nanopartículas)
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PBS	- Tampão fosfato salino
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
QCM	- <i>Quartz Crystal Microbalance</i> (Microbalança de Cristal de Quartzo)
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono 13
SAM	- <i>Self-assembled Monolayer</i> (Monocamada auto-organizada)
Sb ⁺⁵	- Antimônios pentavalentes
SDS	- <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
SEC	- <i>Size Exclusion Chromatography</i> (Cromatografia de exclusão por tamanho)
SP	- <i>Surface Plasmons</i> (Plásmons de superfície)
SPR	- <i>Surface Plasmon Resonance</i> (Ressonância de plásmons de superfície)
TCh	- Quitosana tiolada
TCh-AgNPs	- Nanopartículas de prata estabilizadas com quitosana tiolada
TCh-AgNPs@Ac	- Nanopartículas de prata estabilizadas com quitosana tiolada recobertas com anticorpo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivo geral.....	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 LEISHMANIOSE.....	19
2.1.1 Tratamento.....	21
2.1.2 Diagnóstico.....	22
2.2 BIOSSENSORES BASEADOS NA TÉCNICA DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE.....	24
2.3 TERANÓSTICOS.....	29
2.4 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	29
2.5 QUITOSANA E SEUS DERIVADOS.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 PURIFICAÇÃO DA QUITOSANA.....	35
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	35
3.3 MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA.....	37
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA TIOLADA.....	38
3.5 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	39
3.6 ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM QUITOSANA TIOLADA.....	40
3.7 CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPS E TCH-AGNPS.....	42
3.8 LIGAÇÃO COVALENTE DOS ANTICORPOS NA SUPERFÍCIE DAS TCh-AgNPs.....	43
3.9 CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES.....	45
3.10 IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA RK39 EM SORO.....	48
3.11 CULTIVO CELULAR.....	50
3.11.1 Atividade hemolítica.....	50
3.11.2 Citotoxicidade em macrófagos.....	51
3.11.3 Ensaio cometa.....	52
3.11.4 Atividade anti-Leishmania para formas promastigotas.....	53
3.11.5 Infecção experimental de macrófagos.....	54

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
4.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	55
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA TIOLADA.....	61
4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	67
4.4 ESTABILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM QUITOSANA TIOLADA.....	71
4.4.1 Escolha da metodologia para a síntese das TCh-AgNPs.....	71
4.4.2 Avaliação da capacidade de recobrimento da TCh.....	77
4.4.3 Influência da temperatura.....	80
4.4.4 Avaliação da estabilização do radical ABTS ^{•+}	82
4.5 LIGAÇÃO COVALENTE DOS ANTICORPOS NA SUPERFÍCIE DAS TCH- AGNPS.....	84
4.6 CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES.....	89
4.7 IMUNODIAGNÓSTICO DA PROTEÍNA RK39.....	92
4.8 IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA RK39 EM SORO.....	99
4.9 CULTIVO CELULAR.....	100
4.9.1 Atividade hemolítica.....	100
4.9.2 Citotoxicidade em macrófagos.....	102
4.9.3 Ensaio cometa.....	104
4.9.4 Atividade anti-Leishmania para formas promastigotas.....	106
4.9.5 Infecção experimental de macrófagos.....	109
5 CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS.....	116

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTN), como a leishmaniose visceral, são doenças infecciosas e parasitárias prevalentes em regiões tropicais e subtropicais, endêmicas em populações de baixa renda. Os métodos para diagnóstico da leishmaniose visceral são antigos e inadequados, sendo realizados por exames de sangue que exigem operadores treinados, ou por testes moleculares, que demoram na resposta do teste, demandando assim testes mais simples e efetivos. Além da dificuldade de diagnóstico, o tratamento da leishmaniose apresenta alta toxicidade e baixas taxas de eficácia, além de apresentar resistência medicamentosa (VERMELHO et al., 2015).

Uma alternativa atual para contornar estas dificuldades é a criação de partículas teranósticas. Estas partículas atuam na terapia e diagnóstico de forma simultânea, podendo ser partículas poliméricas, lipídicas, inorgânicas ou proteicas (HUANG; LOVELL, 2017). Uma opção de partículas teranósticas são as nanopartículas de prata, que possuem boas propriedades ópticas, antimicrobianas e antiparasitárias. As nanopartículas de prata já são amplamente aplicadas como sensores na detecção de analitos. Porém, um obstáculo na utilização de partículas metálicas como teranósticos é a sua instabilidade coloidal que resulta na agregação das partículas (BHATTARAI et al., 2018). Desta forma, a utilização de agentes estabilizantes confere às partículas uma redução da área superficial e a estabilidade coloidal destes materiais. Uma boa alternativa de agente estabilizante é a quitosana, um polímero derivado da quitina que apresenta vasta aplicação biológica, como sistema de entrega de fármacos, ação antimicrobiana e cicatrizante (WAYS et al., 2018).

Estas nanopartículas podem ser utilizadas na formação de partes de biossensores aplicados ao diagnóstico de doenças. Biossensores são dispositivos analíticos que empregam elementos de reconhecimento de origem biológica para detecção de analitos de interesse, tal como biomarcadores, em amostras complexas. Esses sensores podem ser explorados como ferramentas alternativas de diagnósticos para diferentes doenças. A união de partículas metálicas com componentes biológicos, como por exemplo anticorpos, consiste em uma estratégia interessante na construção de componentes de biossensores, de forma a melhorar a performance analítica do sensor para permitir o diagnóstico precoce de doenças. Sabe-se que a

quitosana nativa e estruturas contendo grupos sulfidrilas, como proteínas, tem capacidade de estabilizar nanopartículas de prata (LEICHNER et al., 2019), podendo ser uma boa alternativa de agente estabilizante.

Além da capacidade de compor estruturas de biossensores, as nanopartículas metálicas apresentam a capacidade de estimular espécies reativas de oxigênio, podendo atuar como uma possível alternativa para o tratamento da leishmaniose, uma vez que os contrapontos dos tratamentos atuais apresentam desafios significativos que exigem uma abordagem cuidadosa e contínua. Embora os medicamentos existentes tenham demonstrado eficácia na redução dos sintomas e controle da doença, podem causar efeitos colaterais graves, tornando-os menos toleráveis para alguns pacientes especialmente em tratamentos de longa duração (SANTOS et al., 2020). Dessa forma, a pesquisa por novos tratamentos é um ponto importante para a melhora do quadro da doença. Além disso, a ação sinérgica da quitosana nativa e da prata já apresentam capacidades anti-leishmania descritas na literatura.

Com base nas informações citadas anteriormente, este trabalho teve como objetivo a modificação da estrutura da quitosana com a inserção de grupos sulfidrilas, bem como testar este polímero modificado na estabilização de nanopartículas de prata. Após esta etapa, foi realizada a ancoragem de anticorpos na superfície da nanopartícula formada, de forma a torná-la bifuncional e, por conseguinte, permitir sua exploração como componente de um biossensor para finalidade de diagnóstico e em um possível tratamento para a leishmaniose visceral. Parâmetros de segurança e toxicidade também foram estudados para verificar a aplicabilidade das partículas formadas em relação as células humanas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar nanopartículas de prata estabilizadas com quitosana modificada na terapia e no diagnóstico de doenças negligenciadas, com foco na leishmaniose.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Purificar e caracterizar a quitosana por técnicas espectroscópicas e cromatográficas e quantificar seu grau de desacetilação;
- b) Modificar a quitosana para a obtenção da quitosana tiolada;
- c) Caracterizar o polímero modificado por técnicas colorimétricas, espectroscópicas e cromatográficas;
- d) Sintetizar nanopartículas de prata estabilizadas com a quitosana modificada;
- e) Caracterizar as nanopartículas quanto ao potencial zeta, tamanho hidrodinâmico e presença de grupamentos sulfidrilas;
- f) Realizar a ligação dos anticorpos monoclonais anti-rK39 de *Leishmania donovani* na superfície da partícula;
- g) Analisar e comparar o potencial de imunodeteção de proteínas rK39 por nanopartículas recobertas com anticorpos e anticorpos livres;
- h) Analisar o potencial citotóxico das nanopartículas formadas (TCh-AgNPs e TCh-AgNPs@Ac) em células humanas, como hemácias, leucócitos e macrófagos;
- i) Analisar a atividade leishmanicida em formas promastigotas e amastigotas do protozoário empregando as nanopartículas e as nanopartículas recobertas com anticorpo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitida aos seres humanos por meio da saliva de flebotomíneos infectados. Esta doença pertence às doenças tropicais negligenciadas (DTNs), grupo classificado como problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; VERMELHO et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016). A doença é endêmica em 101 países, prevalece em regiões tropicais e subtropicais e afeta principalmente lugares onde há nichos de flebotomíneos, em partes da África, Ásia, Europa e América Latina, afetando milhões de pessoas em todo o mundo.

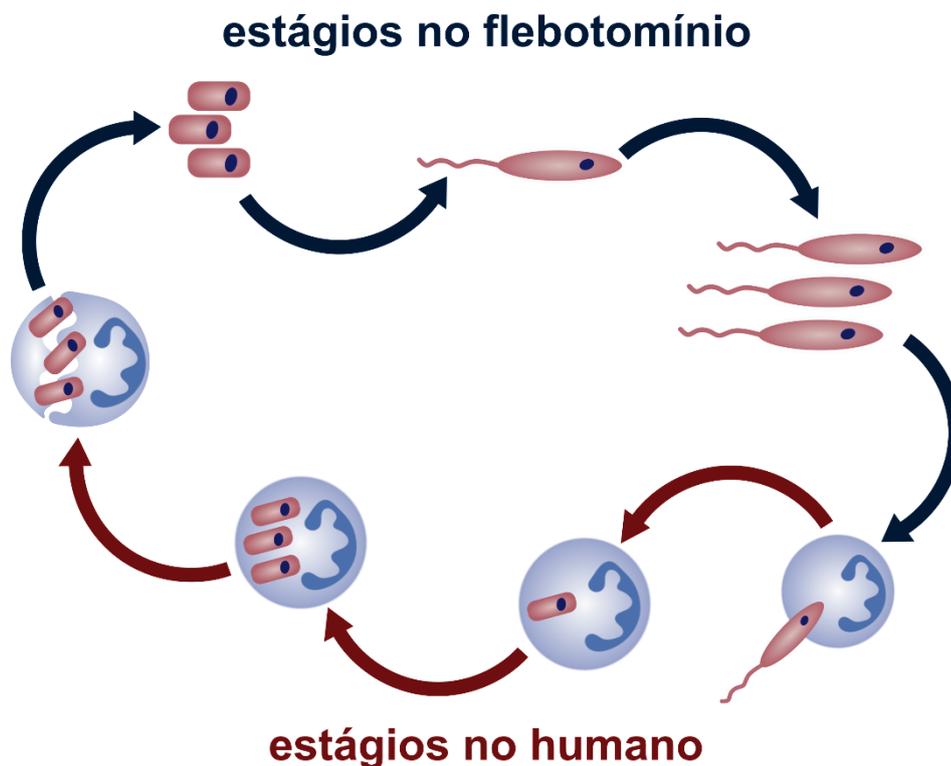
A transmissão da leishmaniose ocorre por flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia* contaminadas com protozoários. Dependendo da espécie de *Leishmania*, a doença apresenta diferentes manifestações clínicas, divididas em três formas principais: cutânea (LC) e mucocutânea (LM), comprometendo pele e mucosas, e visceral (LV), que acomete órgãos vitais, como fígado, baço e medula, podendo ser fatal se não for tratada (ASSCHE et al., 2011; VERMELHO et al., 2015; BURZA et al., 2018). Os principais agentes etiológicos para a LC são *L. major* e *L. tropica*, para LM são *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e para LV são *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*.

Em 2020, o Brasil fez parte da lista de dez países mais afetados pela doença representando mais de 97% dos casos nas Américas (OMS, 2022). Já em 2022, foram contabilizados quase 13 mil casos de LC e 2 mil casos de LV. Atualmente, o Brasil está presente no ranking de quantidade de casos de LV e LC, sendo o segundo lugar em países com endemia de LV, ficando atrás apenas do Sudão, e terceiro colocado na quantidade de casos de LC, ficando atrás da Síria e do Afeganistão (OMS, 2023).

O ciclo de vida do parasita ocorre em dois estágios: nos flebotomíneos e nos humanos (FIGURA 1). A infecção humana ocorre quando o flebotomíneo infectado insere as formas promastigotas flageladas do parasita na pele, onde são fagocitadas por macrófagos e células mononucleares. Nessas células, as promastigotas se convertem em amastigotas e se replicam, causando a ruptura da célula contaminada e infectando outras células. A infecção nos vetores ocorre quando um flebotomíneo

se alimenta de sangue e a forma amastigota é ingerida. No intestino do flebotomíneo, o parasita desenvolve-se em promastigota, onde, por meio da picada, infecta outros humanos (ASSCHE et al., 2011; VERMELHO et al., 2015; BURZA et al., 2018). A diferenciação de promastigota para amastigota leva em torno de 5 dias, enquanto a conversão de amastigotas de novo a promastigotas leva aproximadamente 2 dias para ser concluída (CLOS et al., 2022).

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO PARASITA *Leishmania sp.*



FONTE: A autora (2023).

A imunidade inata está diretamente relacionada com a eliminação do parasita. Porém, aspectos relacionados à imunidade adaptativa devem ser considerados para o melhor entendimento do processo infeccioso. Após a inoculação do parasita no hospedeiro através do vetor, é dado início a um processo pró-inflamatório onde células fagocíticas são atraídas para o local da infecção. As células que se destacam pela sua importância neste período infeccioso são os macrófagos, que fagocitam a *Leishmania* em um fagolisossomo. A fagocitose do parasita envolve três eventos, a ligação dos receptores, a formação do vacúolo durante a fagocitose e a degradação

do parasita pela formação espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) (COSTA-DA-SILVA et al., 2022).

O evento inicial na infecção por *Leishmania* envolve o primeiro contato e a interação estável entre as formas promastigotas do parasita e as células hospedeiras. O reconhecimento e a fagocitose dessas promastigotas podem ser mediados por diversas moléculas presentes na superfície de macrófagos (COSTA-DA-SILVA et al., 2022). A estimulação do macrófago desempenha um papel crucial na resposta do sistema imunológico à infecção por *Leishmania*, que podem ser ativados de duas maneiras principais: ativação tipo 1 (M1) e ativação tipo 2 (M2). A ativação M1 é associada a uma resposta pró-inflamatória, onde os macrófagos produzem citocinas como o óxido nítrico (NO) para combater o parasita. No entanto, a *Leishmania* possui mecanismos para bloquear a ativação M1 e promover a ativação M2, que é anti-inflamatória e facilita a sobrevivência do parasita dentro dos macrófagos (COSTA-DA-SILVA et al., 2022). Os macrófagos e células dendríticas ativam a sinalização de receptores e desencadeiam uma cascata de secreção de interleucinas (IL-12) que estimulam células NK (*natural killer*) a produzir interferon- γ (IFN- γ). Os macrófagos são então estimulados a produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) e óxido nítrico para a eliminação oxidativa do parasita (AKBARI et al., 2021; FREITAS E SILVA; STEBUT, 2021; CONDE et al., 2022).

2.1.1 Tratamento

Todas as terapias atuais apresentam alta toxicidade e demandam um longo tempo de tratamento, o que dificulta a adesão pelo paciente e pode acarretar resistência medicamentosa. Além disso, há um baixo número de fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose, sendo divididos em tratamentos de primeira e segunda linha (KAMMONA; TSANAKTSIDOU, 2021).

Os tratamentos considerados primeira linha contra leishmaniose são principalmente os antimônios pentavalentes (Sb^{+5}), como estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime®). Na segunda linha estão disponíveis a anfotericina B, a anfotericina B lipossomal (AmBisome®) e a miltefosina (Milteforan) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ANVERSA et al., 2018). A recomendação de tratamento com os antimônios é de 20mg de Sb^{+5} kg/dia por no mínimo 20 e no máximo 40 dias, sendo aplicados via intramuscular ou endovenosa.

Caso este tratamento não apresente eficácia, a anfotericina B é utilizada na dose de 1 mg/kg/dia, em dias alternados. A complexidade deste tratamento muitas vezes leva à desistência ou à não-adesão do tratamento, fazendo com que o quadro clínico do paciente piore.

Além disso, a toxicidade destes tratamentos podem levar a cardiopatias, pancreatites, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (PRADHAN et al., 2022). O acompanhamento rigoroso dos pacientes durante o tratamento é crucial para garantir que os medicamentos sejam eficazes e bem tolerados. A busca por novos tratamentos que sejam administrados por via oral, ou com um tempo menor de tratamento continua, porém ainda não há substitutos para o atual tratamento com uma redução dos efeitos adversos e da toxicidade (SANTOS et al., 2020).

2.1.2 Diagnóstico

Dado o potencial de disseminação, relevância e gravidade da doença, a leishmaniose é uma doença de notificação compulsória. Portanto, caso ocorra a suspeita ou confirmação da doença, as autoridades sanitárias devem ser notificadas imediatamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O controle realizado pela notificação compulsória fornece a identificação da realidade epidemiológica e informações sobre a ocorrência na população.

Um dos pontos mais importantes em relação a leishmaniose é o controle a disseminação da doença e rápido diagnóstico. Os métodos diagnósticos convencionais são baseados em sintomas clínicos e exames parasitológicos, moleculares e imunológicos (ASSOLINI et al., 2022). A identificação das formas evolutivas do parasita é principalmente utilizada e associada a outro tipo de teste, como os ensaios moleculares e sorológicos. A detecção da forma amastigota em tecidos é feita por meio de exame microscópico de identificação do parasita e o isolamento da forma promastigota em cultivo celular envolve biópsia de tecidos e órgãos, como baço, medula óssea ou linfonodo. Os achados microscópicos, embora considerados padrão-ouro, muitas vezes são inacessíveis devido a necessidade de equipamentos específicos e mão de obra especializada (KUMARI et al., 2021). Outra opção é a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR), um ensaio molecular que aumenta a sensibilidade e especificidade da detecção.

Entretanto, o PCR é um exame complexo, dificultando sua implementação em países subdesenvolvidos (BURZA et al., 2018; KAMMONA; TSANAKTSIDOU, 2021).

Testes sorológicos, como os testes imunológicos, foram desenvolvidos para facilitar o diagnóstico e são considerados uma técnica promissora, principalmente por detectar antígenos e anticorpos de forma não-invasiva (KUMARI et al., 2021). Os mais utilizados são a imunofluorescência, teste de aglutinação, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA - do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e imunocromatográfico, para detecção de anticorpos (VERMELHO et al., 2015). A identificação de biomarcadores, como as proteínas e antígenos específicos para a forma promastigota ou amastigota pode melhorar a especificidade dos testes. Para as formas amastigotas, o antígeno recombinante A2 e os antígenos rK39, gp36, gp70 e gp72 têm sido utilizados para identificar e confirmar a infecção por leishmania (TAVARES et al., 2003).

A proteína K39 é membro da família das cinesinas com repetições de 39 aminoácidos e é altamente conservada entre as espécies de *Leishmania*, principalmente associadas à LV. Após sua identificação e isolamento, a detecção de anticorpos IgG para este antígeno é uma metodologia sensível e específica para o sorodiagnóstico e acompanhamento do prognóstico da doença (BRAZ et al., 2002; FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016). O antígeno recombinante K39 (rK39) é sintetizado a partir da clonagem do K39, e é então colocado em tiras de celulose durante a produção dos testes diagnósticos rápidos para a LV (GUIMARÃES CARVALHO et al., 2003; SANCHEZ et al., 2020).

Neste contexto, o uso de metodologias alternativas para diagnóstico, assim como a utilização de estruturas e sistemas que facilitem o diagnóstico pode reduzir a lacuna entre diagnóstico-início do tratamento, reduzindo os danos causados pelo parasita e aumentando a qualidade de vida do paciente. A utilização de biossensores (colorimétricos, fluorescência, eletroquímicos, impedimétricos, nanopartículas metálicas, *quantum dots*) é descrita na literatura como alternativa para a rápida detecção de *Leishmania* spp. (PERINOTO et al., 2010; GEDDA et al., 2019; SOUTO et al., 2019; MARTINS et al., 2020).

Os biossensores são dispositivos analíticos constituídos de um componente biológico que associados a transdutores permitem a detecção de analitos-alvo e a conversão do reconhecimento biológico em sinais quantificáveis (LIM et al., 2020). A detecção de biomarcadores, enzimas e biomoléculas presentes no metabolismo de

doenças, pode ser realizada por sistemas ópticos, eletroquímicos e mecânicos (CHADHA et al., 2022).

Diversos autores estudaram diferentes abordagens para desenvolver um método fácil e rápido para detectar o parasita e descobrir moléculas novas e seguras para o tratamento da doença (SILVA et al., 2013; FERREIRA et al., 2017; SOUZA et al., 2018; GEDDA et al., 2021). Como exemplo, destaca-se a construção de biossensores baseados na técnica de biodetecção de ressonância plasmônica de superfície (do inglês *Surface Plasmon Resonance* - SPR).

2.2 BIOSSENSORES BASEADOS NA TÉCNICA DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE

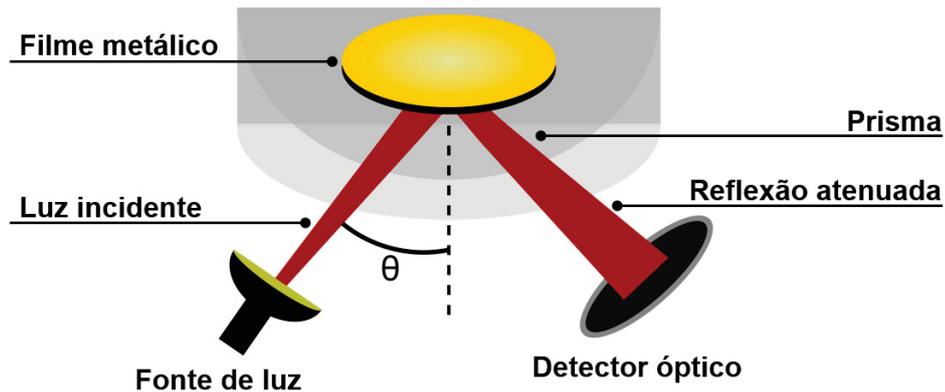
O fenômeno de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) pode ser observado quando um feixe de luz monocromático atravessa um sistema óptico de elevado índice de refração, como um prisma, e incide sobre a superfície de um metal. Neste momento, os elétrons de superfície oscilam de forma coletiva, sendo chamados de plásmons de superfície (SP - *Surface Plasmons*), e há a formação de um campo eletromagnético na interface metal/dielétrico (ouro/ar, por exemplo) devido à propagação das ondas de plásmons de superfície (OPS) (ENGLEBIENNE et al., 2003; ZENG et al., 2013).

Em um biossensor baseado em SPR, a interação entre o receptor biológico e o analito de interesse provoca uma variação no índice de refração local próximo à interface, resultando em alterações das condições de acoplamento entre a onda incidente e a onda de plásmons de superfície. Estas alterações são caracterizadas por variação de alguma propriedade da onda incidente, como a variação do ângulo de incidência, comprimento de onda e intensidade da luz (HOMOLA, 2008).

Na técnica de detecção SPR que explora o fenômeno de reflexão interna total atenuada (configuração de Kretschman) (FIGURA 2), utilizada nesse trabalho, o equipamento é constituído de um substrato de vidro recoberto com um filme nanométrico de ouro, posicionado sobre um prisma, onde o comprimento de onda e a intensidade da luz incidente são mantidos constantes durante todo o processo. Nesta configuração, uma grande parte da onda eletromagnética é absorvida pelos elétrons para gerar plásmons de superfície. Para isso, um alto ângulo de incidência do laser é necessário (MAYER; HAFNER, 2011). Sendo assim, mudanças no índice de refração

local provocadas pelas interações biomoleculares são caracterizadas em tempo real através da variação do ângulo de incidência da luz, chamado de ângulo de SPR (θ_{SPR}) (ZENG et al., 2013; SCHASFOORT, 2017).

FIGURA 2 – FUNCIONAMENTO DA TÉCNICA DE DETECÇÃO POR SPR NA CONFIGURAÇÃO DE KRETSCHEMANN



FONTE: A autora (2023).

A técnica de SPR é utilizada para monitorar as mudanças na espessura ou no índice de refração de filmes ultrafinos em superfícies metálicas, avaliando processos de interações interfaciais e superficiais sobre o aparato. A SPR pode ser explorada na detecção de pequenas quantidades de analito sobre o substrato, além de fornecer importantes parâmetros cinéticos e termodinâmicos referentes às interações biomoleculares (ENGLEBIENNE et al., 2003).

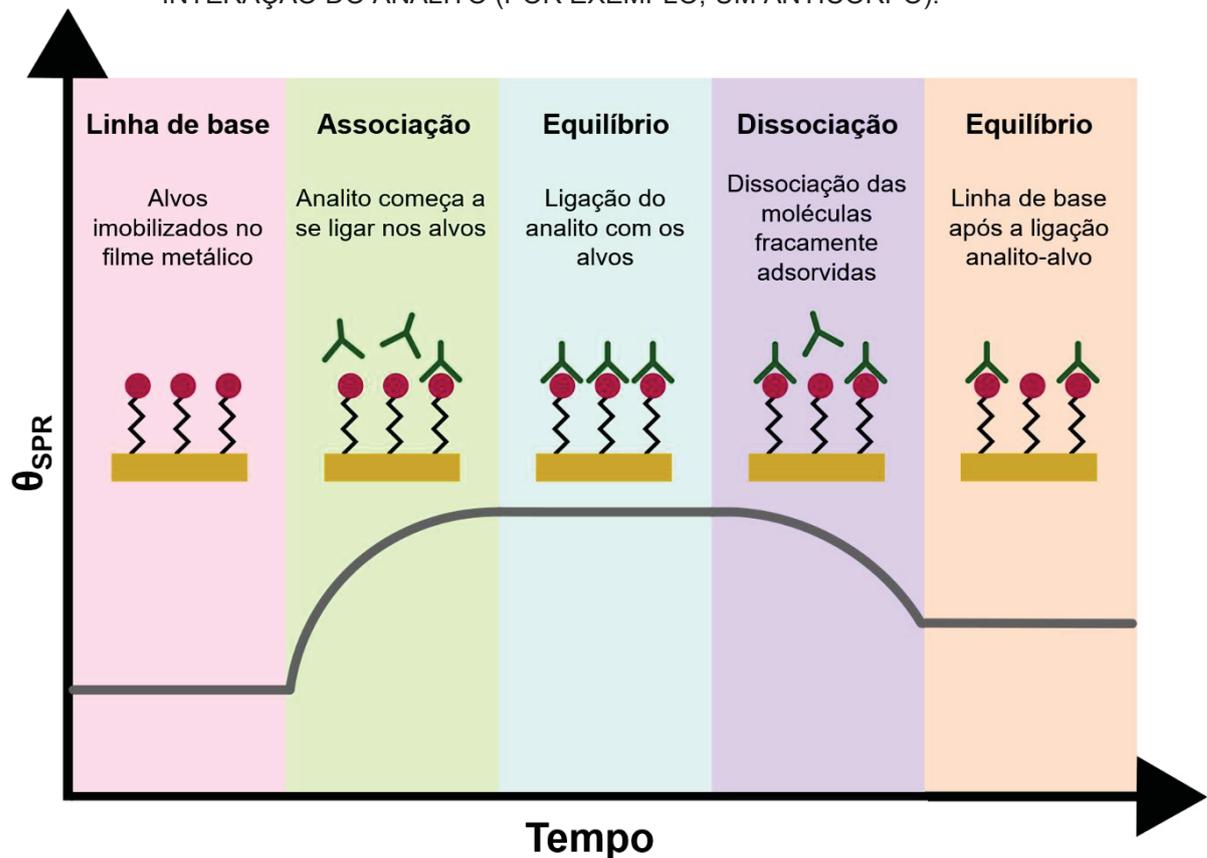
Quando uma proteína é imobilizada sobre o chip sensor, um ligante (seja ele uma partícula, anticorpo ou outro biomaterial) é adicionado a um tampão que flui pelo chip, favorecendo a associação entre proteína-ligante. Após o alcance do equilíbrio, etapas de lavagem são realizadas para remover as espécies fracamente adsorvidas (etapa de dissociação). Este processo pode ser repetido com diferentes concentrações de ligante em toda a área do disco e, ao fim, o chip pode ser reutilizado após passar por etapas de limpeza que removem os materiais funcionalizados anteriormente. É muito comum acompanhar as etapas de associação e dissociação oriundas dos processos biomoleculares por meio de sensorgramas ($\Delta\theta_{SPR}$ vs. tempo) (SCHASFOORT, 2017).

A Figura 3 apresenta um exemplo de esquema dos estágios de detecção de analitos no sensor de SPR. Neste exemplo, após a imobilização das biomoléculas

sobre o filme metálico (por exemplo, a proteína rK39), a linha de base é obtida. A etapa de associação ocorre quando o analito começa a interagir e ligar-se aos receptores (ou biomoléculas) ancorados, chegando a uma etapa de equilíbrio. Ao lavar o sistema novamente, com água ou solução tampão, os analitos fracamente associados se dissociam com o tempo, até atingir novamente uma etapa de equilíbrio. A variação de θ_{SPR} observado entre a linha de base e a etapa de equilíbrio após a dissociação é um parâmetro que indica, principalmente, a capacidade de associação entre o analito e a biomolécula aderida na superfície do sensor.

Através de modelos matemáticos, podem ser definidos parâmetros como as constantes de associação, dissociação e de afinidade de interação entre o ligante e a proteína imobilizada (ENGLEBIENNE et al., 2003).

FIGURA 3 – ESQUEMA DESCRITIVO DAS ETAPAS DE DETECÇÃO DE ANALITOS NO SENSOR SPR. NESTE EXEMPLO, A IMOBILIZAÇÃO DE UMA BIOMOLÉCULA (COMO POR EXEMPLO, UMA PROTEÍNA) OCORRE SOBRE O SUBSTRATO DE OURO E HÁ A INTERAÇÃO DO ANALITO (POR EXEMPLO, UM ANTICORPO).



FONTE: A autora (2023).

Técnicas de detecção tradicionais, como o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), requerem o uso de marcadores para amplificar o sinal resposta, como por exemplo o uso de corantes e moléculas fluorescentes. A detecção de anticorpos por ELISA ocorre pela interação do antígeno com um anticorpo específico e uma segunda captura de anticorpo conjugado a uma enzima, que catalisa uma reação química, gerando o sinal-resposta mensurável (geralmente uma mudança de cor). Entretanto, as diversas etapas envolvidas neste tipo de técnica podem afetar as interações alvo-sensor.

Sensores *label-free* fazem uso de biomoléculas em seu estado mais natural possível, onde uma propriedade da molécula-alvo é detectada como o tamanho, a carga superficial, a impedância elétrica ou índice de refração (SAMUEL; RAO, 2022). Testes de imunoensaio, por exemplo, fazem uso de dois ou mais anticorpos para uma molécula alvo, enquanto sensores *label-free* utilizam apenas um. Desta forma, além de reduzir etapas e reagentes, é possível realizar a análise da cinética de ligação da molécula alvo no sensor (MAYER; HAFNER, 2011).

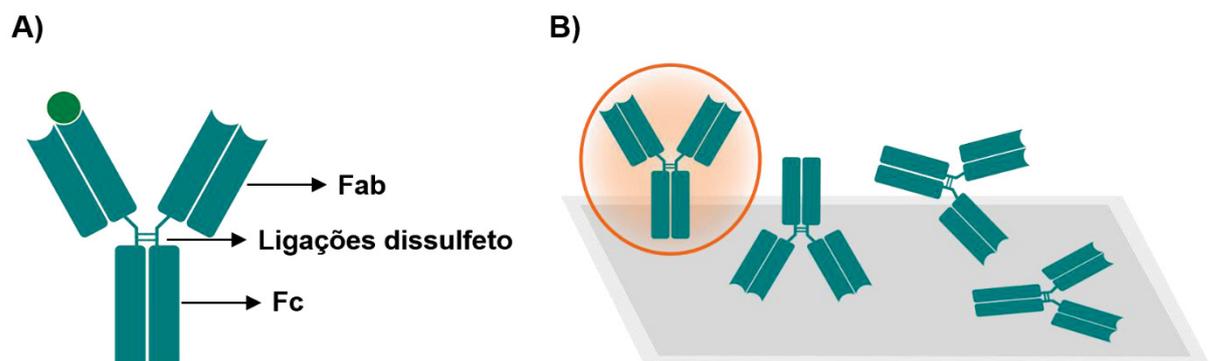
A utilização de biossensores *label-free* de SPR torna-se interessante pois apresenta um aumento de sensibilidade na elucidação das interações que ocorrem em sua superfície, como, por exemplo, as interações antígeno-anticorpo exploradas no diagnóstico de doenças. As análises também podem ser realizadas em tempo real com alta especificidade e concentrações muito baixas de analito são detectados (SAMUEL; RAO, 2022). Além disso, requer pouco material e é uma técnica de resposta rápida, o que é determinante em um diagnóstico (ENGLEBIENNE et al., 2003).

Os anticorpos são moléculas importantes para o sistema de defesa. Sua função biológica é ligar-se aos patógenos e auxiliar na sua eliminação. A presença de anticorpos pode ser utilizada na identificação de infecções recentes em diferentes estágios, de infecções passadas, do estado atual de imunidade ou até na resposta de vacinas (GENG et al., 2022). Por meio de diferentes tipos de interações, o anticorpo reconhece o epítipo, uma pequena parte do patógeno, como polissacarídeos ou proteínas de superfície (REGENMORTEL, 2019). Essas moléculas apresentam uma estrutura que genericamente pode ser representada na forma de Y, de forma a enfatizar suas duas cadeias polipeptídicas leves e suas duas pesadas que estão ligadas por ligações dissulfeto. As cadeias leves (25 kDa) (fragmento de ligação ao antígeno - fragmentos F_{ab}) apresentam uma região variável e uma constante,

enquanto as cadeias pesadas (50 kDa) (fragmento cristalizável - fragmentos F_c) são compostas por três (IgG, IgA, IgD) ou quatro (IgM e IgE) regiões constantes (FIGURA 4 - A) (MIX et al., 2006). As cadeias são espelhadas e idênticas, formando dois sítios de ligação ao antígeno, localizados na parte superior dos anticorpos (CHIU et al., 2019). O fragmento F_c não contém atividade de ligação com o antígeno (RYMAN; MEIBOHM, 2017).

Na construção de um biossensor, a imobilização do anticorpo em um substrato ou partícula pode ser realizada via ligação covalente ou adsorção física. Idealmente, os anticorpos devem ser orientados em um arranjo em que os fragmentos Fab estejam livres para a ligação complementar do antígeno (NGUYEN et al., 2015). A ancoragem aleatória no substrato aumenta o impedimento estérico da porção Fab ou a desativa (WELCH et al., 2017) (FIGURA 4 - B). Uma abordagem covalente realizada para garantir a imobilização de biomoléculas, minimizando as adsorções não específicas e assegurar a orientação correta dos anticorpos no substrato é através da formação de uma monocamada auto-organizada (do inglês Self-assembled monolayer – SAM).

FIGURA 4 – (A) ESTRUTURA DO ANTICORPO: DUAS CADEIAS PESADAS (FRAGMENTOS F_c) E DUAS CADEIAS LEVES CADEIAS (FRAGMENTOS F_{ab}) LIGADAS POR LIGAÇÕES DISSULFETO. (B) ORIENTAÇÕES DO ANTICORPO SOBRE UM SUBSTRATO, DESTACANDO A FORMA CORRETA DE ORIENTAÇÃO COM AS PORÇÕES F_{ab} LIVRES PARA A CAPTURA DO ANTÍGENO (DESTACADA EM LARANJA)



FONTE: A autora (2023).

A formação da SAM proporciona a modificação (funcionalização) da superfície para a ligação covalente entre os grupos funcionais dos anticorpos e a superfície. A ligação da biomolécula com a superfície ativada é normalmente obtida pelo

acoplamento EDC/NHS (Hidrocloroeto de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida/N-hidroxissuccinimida), através de seus grupos funcionais. Tal ligação proporciona uma imobilização melhor orientada de proteínas e anticorpos no substrato podendo assim potencializar a atividade de ligação com o analito (NGUYEN et al., 2015).

Considerando as propriedades e características de biossensores baseados no fenômeno de SPR, é possível destacar a aplicação das nanopartículas neste campo. Além disso, por apresentarem propriedades óticas através da oscilação dos elétrons de superfície em relação a ressonância com a luz incidente, as nanopartículas metálicas atraíram significativa atenção para o diagnóstico precoce de doenças através da detecção de biomarcadores.

2.3 TERANÓSTICOS

O termo teranóstico é definido como a combinação de um sinal de diagnóstico com efeito terapêutico, e se refere a uma aproximação do diagnóstico, principalmente em nível molecular ou nano, com a escolha de uma terapia específica para um paciente de forma individualizada (WIESING, 2019). Partindo deste conceito, teranósticos são insumos ou estruturas, principalmente na escala nanométrica, que atuam simultânea ou sequencialmente como diagnóstico e terapia de patologias, podendo ser biomarcadores moleculares, nanopartículas poliméricas, lipídicas, inorgânicas ou proteicas (HUANG; LOVELL, 2017).

Estes sistemas podem ser utilizados emitindo um sinal responsivo a um biomarcador específico, aplicado em exames de imagem como ressonância magnética, tomografia computadorizada de raios X, terapia fotodinâmica, ultrassonografia, fluorescência e luminescência óptica, imagem fotoacústica, terapia guiada por imagem e tomografia de pósitrons (SWIERCZEWSKA et al., 2016; HUANG; LOVELL, 2017)

2.4 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

O uso de nanopartículas de ouro, cobre e prata vem ganhando destaque na área de detecção de analitos devido às suas propriedades óticas. Os LSP (plásmons de superfície localizados) são responsáveis pela coloração característica das

nanopartículas (HUANG; XU, 2010), e o comprimento de onda máximo de absorção (λ_{\max}) dos plásmons pode ser usado para indicar o tamanho das partículas, devido à variação de massa no ambiente em volta da nanopartícula que altera o λ_{\max} (HUANG; XU, 2010; MAYER; HAFNER, 2011). Um máximo da frequência de ressonância plasmônica de superfície de nanopartículas metálicas ocorre em comprimento de onda visível, em ≈ 520 nm para nanopartículas de ouro e ≈ 400 nm para nanopartículas de prata (ALAQAD; SALEH, 2016).

Os deslocamentos espectrais dos LSP ocorrem de forma mais intensa na superfície da partícula, reduzindo sua intensidade com o aumento da distância do núcleo. Portanto, essa detecção permite adquirir informações de interações moleculares na superfície da nanopartícula (MAYER; HAFNER, 2011), o que a torna apta para atuar como biossensor. Para a criação de biossensores *label-free* com nanopartículas de prata, anticorpos são conjugados à superfície das nanopartículas por ligantes biocompatíveis, facilitando a detecção de antígenos (MAYER; HAFNER, 2011).

As nanopartículas de prata, especialmente, têm sido aplicadas como sonda colorimétrica para detecção visual (COBLEY et al., 2009; CHEN et al., 2013), agente antibacteriano (TRAN et al., 2010; SENTHILKUMAR et al., 2019; AHMAD et al., 2020), antifúngico (FERNÁNDEZ et al., 2016; TUTAJ et al., 2016), anticancerígeno (EBRAHIMZADEH et al., 2021) e reparador de feridas (CHOUDHURY et al., 2020). Nanopartículas de prata apresentam uma vantagem ótica sobre as nanopartículas de ouro devido à presença de elétrons condutores que podem ser excitados livremente, melhorando a propagação dos plásmons de superfície, além da coloração diferente (BHATTARAI et al., 2018).

Além da sua capacidade de atuar como parte de um biossensor, vale ressaltar que as nanopartículas de prata vem sendo descritas como também capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que desempenham um papel importante na destruição de parasitas incluindo a *Leishmania* (ALLAHVERDIYEV et al., 2011; LIMA et al., 2017; OVAIS et al., 2017; FANTI et al., 2018).

Embora as nanopartículas de prata apresentem excelentes propriedades ópticas, elas tendem a se aglomerar. Assim, a estabilização destas partículas durante a síntese auxilia a evitar a aglomeração e a oxidação. A estratégia mais utilizada é realizar o capeamento ou imobilização das nanopartículas com agentes estabilizantes, como surfactantes ou biopolímeros (LEE; JUN, 2019). A diminuição da

área superficial e a repulsão das partículas auxilia na estabilidade (SHANMUGARAJ; ILANCHELIAN, 2016; SHARMA et al., 2018), criando um sistema estável que garante a melhor aplicabilidade destas nanopartículas. A toxicidade das nanopartículas de prata é uma preocupação significativa em pesquisas e aplicações, devido à capacidade dessas partículas de interagir com sistemas biológicos. A toxicidade está relacionada ao tamanho, forma, revestimento superficial e concentração das nanopartículas de prata. Portanto, o controle do tamanho e da concentração das nanopartículas de prata, bem como o uso de revestimentos biocompatíveis, são fundamentais para minimizar os riscos à saúde em aplicações biológicas (TORTELLA et al., 2020; JASWAL; GUPTA, 2023).

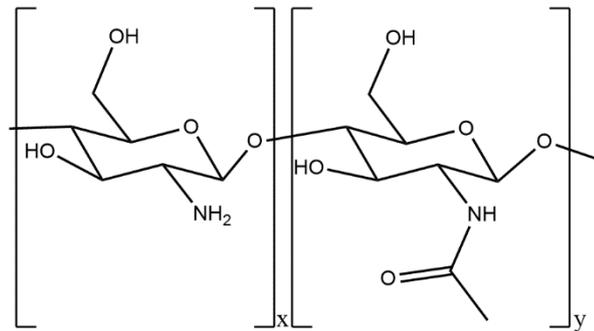
Dentre os polímeros que podem estabilizar as nanopartículas de prata, é possível destacar a quitosana.

2.5 QUITOSANA E SEUS DERIVADOS

As nanopartículas compostas por polímeros são uma excelente opção para compor teranósticos biodegradáveis, biocompatíveis e de baixa toxicidade. Polímeros de origem natural são explorados na indústria farmacêutica por serem versáteis e capazes de substituir componentes tóxicos em formulações, além de serem aplicados em sistemas de encapsulamento e liberação, atuando como modulador da farmacocinética de cápsulas compostas ou revestidas com esses materiais poliméricos (NGWULUKA et al., 2014).

A quitosana é um polímero de origem natural composto por unidades monoméricas de β -D-glucosamina e β -D-N-acetilglucosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4) produzidas por extensa desacetilação alcalina da quitina (RINAUDO, 2006) (FIGURA 5). O uso da quitosana como sistema de liberação de fármacos chama a atenção e está em ascensão, principalmente devido às suas propriedades mucoadesivas e antimicrobianas (WAYS et al., 2018), e sua aplicação como adjuvante de administração de fármacos e vacinas, promotor de cicatrização de feridas e como agente estabilizador de nanopartículas metálicas relatadas em literatura (TRAN et al., 2010; AKMAZ et al., 2013; PATRULEA et al., 2015; FERREIRA et al., 2017; MOHAMMADI; KHAYATIAN, 2017; NAKAL-CHIDIAC et al., 2020).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA, ONDE Y: SUBUNIDADE DE β -D-N-ACETILGLUCOSAMINA E X: SUBUNIDADE DE β -D-GLUCOSAMINA



FONTE: A autora (2023).

A principal vantagem da quitosana sobre outros polímeros é presença de grupamentos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$ que permitem a formação de estruturas auto-associadas através de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (YANG et al., 2014). Porém, a quitosana é uma base fraca, insolúvel em soluções alcalinas e solventes orgânicos, mas solúvel em meio aquoso ácido, por exemplo, soluções aquosas de ácido acético ou soluções de ácido forte, como ácido clorídrico.

O pKa da quitosana é um parâmetro fundamental que descreve as suas propriedades ácido-base em solução. O pKa representa o valor de pH no qual metade das unidades de amina da quitosana estão protonadas (na forma de $-\text{NH}_3^+$) e metade estão desprotonadas (na forma de $-\text{NH}_2$). Geralmente, o pKa da quitosana é encontrado na faixa de 6 a 6,5. Isso significa que em um ambiente ácido a quitosana estará predominantemente na forma protonada, carregada positivamente, enquanto em um ambiente mais alcalino (com pH acima do pKa), ela estará principalmente na forma desprotonada, carregada neutra. A protonação dos grupos amino presentes em sua estrutura gera repulsões eletrostáticas entre as cadeias poliméricas, permitindo a solvatação e a expansão das cadeias, melhorando sua solubilização. A dissolução em pH neutro ou básico só pode ser acessada com uma pré- etapa de dissolução em meio ácido para protonar os grupos amino (RINAUDO et al., 1999a, 1999b).

Para melhorar a solubilidade em pH neutro, os grupos químicos presentes na quitosana podem ser modificados, aumentando a faixa de potencial aplicação. Dependendo da modificação realizada, pode também contribuir para se tornarem responsivas ao ambiente em que se encontram, sejam aplicadas interna ou externamente (CABANE et al., 2012). Estas modificações químicas normalmente são

realizadas nas unidades desacetiladas, sem envolver as ligações glicosídicas e a despolimerização.

Dentre as modificações descritas em literatura, a introdução de grupos sulfidril na quitosana possibilita a formação de ligações dissulfeto, que apresentam maior estabilidade em ambientes extracelulares (levemente oxidantes) em comparação com o ambiente intracelular (redutor), onde os grupos dissulfeto são reduzidos a porções de tiol, desestabilizando as ligações cruzadas entre os componentes da matriz polimérica (CABANE et al., 2012; JIN et al., 2012; LIU et al., 2017; QUINN et al., 2017).

A modificação resulta em uma diminuição do pKa da quitosana tiolada em comparação com a quitosana não modificada, tornando-a mais ácida. Essa redução no pKa é devida à presença dos grupos -SH, que são ácidos mais fortes em comparação com os grupos amino da quitosana (BERNKOP-SCHNÜRCH, 2005; FEDERER et al., 2021) .

Quitosanas tioladas possuem propriedades responsivas e mucoadesivas que podem ser úteis em condições redox e de pH desequilibrados (BERNKOP-SCHNÜRCH et al., 2001; KO et al., 2013; GAO et al., 2014; FEDERER et al., 2021). Sua capacidade de adesão a superfícies biológicas, como por exemplo as mucinas, prolongam o tempo de contato entre a quitosana tiolada e as membranas, podendo atuar como sistemas de liberação de fármacos de ação local. Esta propriedade está ligada diretamente a capacidade de oxidação e redução dos grupamentos tiol na sua estrutura, sendo que um pH mais baixo do meio intensifica a mucoadesividade devido a uma reatividade reduzida dos grupos tiol, resultando em uma menor oxidação antes do contato com a superfície (FEDERER et al., 2021).

Além disso, quitosanas tioladas são amplamente aplicadas como sistemas de liberação de fármacos por meio da via oral (PALMBERGER et al., 2008; SAREMI et al., 2011; SUDHAKAR et al., 2020), nasal (LEE et al., 2006; SINGH et al., 2016), ocular (MORENO et al., 2017; ZAHIR-JOUZDANI et al., 2018) e intravenosa.

Os grupamentos sulfidrilas presentes nas quitosanas tioladas apresentam grande afinidade por metais, o que também possibilita seu uso na estabilização de nanopartículas metálicas para o desenvolvimento de biossensores (LEICHNER et al., 2019). O desenvolvimento de um sistema contendo nanopartículas metálicas, que atuam no auxílio do diagnóstico de doenças e apresentam propriedades

antiparasitárias, estabilizados com polímeros com propriedades biológicas torna-se uma boa alternativa no desenvolvimento de teranósticos.

Já é descrita na literatura a capacidade da quitosana nativa em estabilizar nanopartículas de prata através da redução dos íons de prata pela amina primária da estrutura da quitosana, formando uma dispersão de quitosana que recobre as nanoestruturas de prata (SHEHABELDINE et al., 2022; CANAMA et al., 2023). Este sistema já é empregado na detecção de analitos, como por exemplo na detecção de malation após intoxicação (VASIMALAI; ABRAHAM JOHN, 2013), determinação de glucose (MISCORIA et al., 2006), detecção de mercúrio na água (SHARMA et al., 2018) e até detecção de IgG (ZHANG et al., 2016), além de aprimorar as propriedades antimicrobianas e antiparasitárias, de forma sinérgica (KUMAR-KRISHNAN et al., 2015; LIMA et al., 2017; ZIENKIEWICZ-STRZAŁKA; DERYŁO-MARCZEWSKA, 2020). Entretanto, há poucos relatos do uso da quitosana tiolada em diagnóstico e terapias, além de poucas informações sobre sua interação com nanopartículas metálicas. Seguindo este raciocínio, o uso de quitosana tiolada no capeamento de nanopartículas de prata pode ser interessante para desenvolver uma estrutura que possa ser usada como teranóstico. A superfície destas nanopartículas pode ser modificada com anticorpos para diagnosticar antígenos específicos de *Leishmania* e, ao mesmo tempo, aplicá-las no tratamento da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PURIFICAÇÃO DA QUITOSANA

A quitosana de média massa molar $(C_6H_{11}NO_4)_n(C_8H_{13}NO_5)_m$ (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foi purificada de acordo com a metodologia de Jacumazo et al., 2020. Inicialmente, 5 g de quitosana bruta foram dispersas em 1 L de solução aquosa de ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (Biotec, Brasil), sob agitação por 24 h. Após esse período, a solução foi centrifugada (10^4 g , 25°C , 30 min) e o sobrenadante foi neutralizado com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 10 mol L^{-1} (NaOH - Biotec, Brasil). Uma nova etapa de centrifugação foi realizada (10^4 g , 5°C , 10 min) e o precipitado foi lavado com álcool etílico 99% (Dipalcool, Brasil) e acetona PA (Reatec, Brasil), e posteriormente centrifugado (10^4 g , 5°C , 10 min). O precipitado foi coletado, triturado e seco em estufa a vácuo a 40°C . Este procedimento foi repetido duas vezes.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

A determinação do grau de desacetilação (%GD) da quitosana foi realizada com base no teor de grupos amino ($-\text{NH}_2$) presentes na molécula. Desta forma, a quitosana (250 mg) foi dispersa em 50 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (HCl - Biotec, Brasil) e deixada sob agitação por 24 h. A dispersão foi titulada com uma solução aquosa de NaOH padronizado a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Foi calculada a primeira derivada do volume gasto na titulação em relação ao pH, obtendo-se dois pontos de inflexão em relação ao volume de base. O grau de desacetilação realizado por titulação potenciométrica foi determinado pela Equação 1:

$$\%GD = \left[\frac{16,1 \times (V_2 - V_1) \times M}{m} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

%GD = grau de desacetilação da quitosana;

16,1 = massa molar do grupo amino;

V_1 = corresponde ao 1º pico do gráfico, referente ao volume (mL) de neutralização do ácido forte utilizado como solvente (HCl);

V_2 = corresponde ao 2º pico do gráfico, referente ao volume (mL) de neutralização do grupo NH_3^+ do polímero;

M = molaridade da base utilizada como titulante;

m = massa da quitosana em solução (g).

A caracterização por ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada no Departamento de Bioquímica da UFPR. Os espectros foram adquiridos a 70 °C em água deuterada (D₂O) e ácido acético deuterado (CD₃COOD) (Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, EUA), utilizando um espectrômetro Avance DRX Bruker com frequência de 400 MHz. A quitosana bruta e purificada (30 g L⁻¹) foram dispersas em D₂O:CD₃COOD (100:2 v v⁻¹) sob agitação até a completa solubilização e enviadas para análise. Os deslocamentos químicos das amostras foram comparados aos deslocamentos químicos do solvente residual (CD₃COOD) em 2,08 ppm para o RMN ¹H.

Além da caracterização, a técnica de RMN também foi utilizada, para efeitos de comparação, para calcular o grau de desacetilação, determinado pela Equação 2 (HIRAI et al., 1991):

$$\%GD \left[1 - \left(\frac{\frac{1}{3}I_{CH_3}}{\frac{1}{6}I_{H_2-H_6}} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

I_{CH₃} = integral do CH₃-1 (~2,18 ppm)

I_{H₂-H₆} = soma da integral do H-2 a H-6 (~ 3,83 – 4,03 ppm)

As análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) foram realizadas em espectrômetro Vertex 70 (Bruker, Alemanha) equipado com reflectância total atenuada (ATR), no Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB), do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. As análises foram realizadas com as amostras secas em estufa, com 128 varreduras de acumulação, resolução de 2 cm⁻¹ e número de onda de 400 a 4000 cm⁻¹.

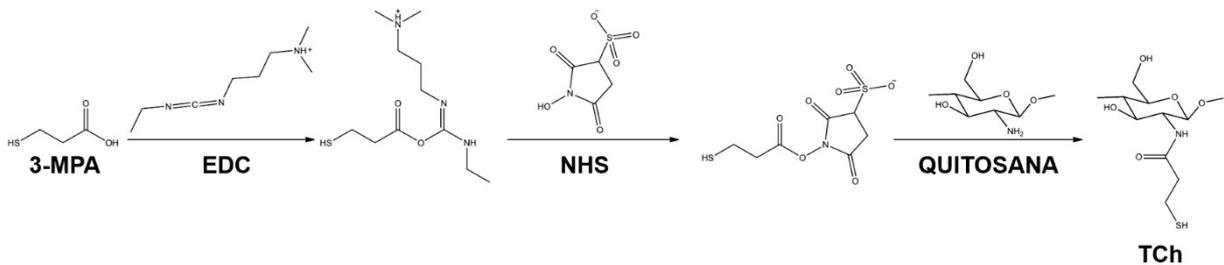
A análise de cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês *Size Exclusion Chromatography* - SEC) foi realizada em um cromatógrafo Viscotek composto por detectores UV/Vis, índice de refração, espalhamento de luz laser, com coluna OHpak SB-806M HQ (Shodex) acoplada a um refratômetro diferencial Viscotek (VE 3210 UV/vis), detector de espalhamento de luz de 90° (RALS) e um detector de espalhamento de laser de baixo ângulo de 7° (LALS) Viscotek 270 que promove uma leitura de espalhamento de luz, captada em diferentes ângulos. A amostra de quitosana purificada foi dispersa em fase móvel (0,5 mg mL⁻¹), solução aquosa de tampão acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ com 200 ppm de azida de sódio (Vetec, Brasil),

filtrada em membrana de éster de celulose de 0,22 μm e injetada no equipamento (100 μL) sob um fluxo de 0,4 mL min^{-1} . A solução aquosa de tampão acetato de sódio (0,1 mol L^{-1} , pH 4,72) foi preparada com ácido acético e acetato de sódio (Vetec, Brasil).

3.3 MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA

Para incorporar os grupos sulfidril à quitosana, a quitosana tiolada (TCh) foi preparada acoplando a quitosana purificada com o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA - Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) formando ligações amida através da reação mediada por EDC-NHS (KO et al., 2013), como detalhado na Figura 6.

FIGURA 6 – REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA COM ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO (3-MPA) MEDIADA POR EDC/NHS PARA A OBTENÇÃO DA QUITOSANA TIOLADA (TCh)



LEGENDA: 3-MPA (ácido 3-mercaptopropanoico), EDC (Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida), NHS (N-hidroxissuccinimida) e TCh (quitosana tiolada).

FONTE: A autora (2023).

A quitosana purificada (1,2 mg mL^{-1}) foi dispersa em água deionizada (500 mL) com 5 mL de uma solução aquosa de HCl 0,1 mol L^{-1} . Em paralelo, 100 mL de EDC (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) (0,2 mol L^{-1} em água deionizada), 100 mL de NHS (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) (0,2 mol L^{-1} em água deionizada), e 2,037 g de MPA foram misturados. Esta última solução foi adicionada à dispersão de quitosana, o pH foi ajustado para 5 com uma solução aquosa de NaOH 0,1 mol L^{-1} e a reação foi mantida sob agitação, protegida da luz e à temperatura ambiente por 24 h. A concentração final de cada componente foi de 1 mg mL^{-1} para a quitosana e 0,016 mol L^{-1} para o EDC, NHS e MPA. Esta dispersão foi colocada em membranas de diálise de éster de celulose de diâmetro de poro de 12-14kDa e dialisada contra uma solução

aquosa de cloreto de sódio (NaCl – Vetec, Brasil) (1 mol L^{-1}), liofilizada e armazenada a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ (GAO et al., 2014).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA TIOLADA

A quantificação dos grupos sulfidril livres no polímero foi realizada através do Ensaio de Ellman, com o reagente ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), também conhecido como DTNB (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), no qual os grupos tióis (-SH) contidos na molécula reagem com o DTNB, clivando a ligação dissulfeto para formar o ânion 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^{2-}), produzindo um produto de cor amarela mensurável em 412 nm.

O ensaio foi realizado da seguinte forma: soluções aquosas contendo 2,5 mL do tampão de reação (tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0, contendo 1 mmol L^{-1} de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)), 50 μL de solução de DTNB (4 mg de DTNB em 1 mL de um tampão de reação) e 250 μL das amostras (1 mg mL^{-1}) foram misturadas, incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 412 nm. A solução aquosa de tampão fosfato de sódio (PBS) ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0, contendo 1 mmol L^{-1} de EDTA) foi preparada com cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico e EDTA adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os grupos sulfidril foram quantificados através de uma curva de calibração analítica realizada com cisteína-L-cloridrato (Synth, Brasil) de 0,1 a 1 mmol L^{-1} .

O teor de ligações dissulfeto no polímero foi determinado após redução do polímero com borohidreto de sódio (NaBH_4 – Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) conforme descrito por Kafedjiiski et al., 2005. A TCh (1 mg mL^{-1}) foi hidratada com uma solução aquosa de tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2. Após 30 minutos, foram adicionados 4 mL de solução de NaBH_4 (4% m v^{-1} em água deionizada) recém-preparada e a mistura foi incubada por 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Para inativar o NaBH_4 restante, 1 mL de solução aquosa de HCl (5 mol L^{-1}) foi adicionado e deixada agitando por 10 minutos. Posteriormente, o ensaio de Ellman foi realizado.

A cinética de redução das ligações dissulfeto presentes no TCh foi desenvolvida para garantir a redução completa, a fim de manter os grupos -SH disponíveis para a interação sequencial com a prata. Desta forma, 5 mL de uma dispersão de TCh em diferentes concentrações (0,25/0,50/0,75/1,00 mg mL^{-1} em água

deionizada) foram adicionadas a uma solução de NaBH_4 (2 mmol L^{-1} em água deionizada). Alíquotas de 1 mL foram retiradas em intervalos de tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos (KAFEDJIISKI; FÖGER; et al., 2005). Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de uma solução aquosa de acetaldeído (2 mmol L^{-1}), para inativar o NaBH_4 restante. Posteriormente, foram retirados 250 μL desta solução para realização do ensaio de Ellman.

A caracterização do polímero modificado foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN). O espectro da TCh (30 g L^{-1} em água deuterada - D_2O) foi adquirido a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando o espectrômetro Avance DRX Bruker 400 MHz, no centro de Ressonância Magnética Nuclear localizado no Departamento de Bioquímica da UFPR. Os deslocamentos químicos foram comparados aos deslocamentos químicos do solvente residual (D_2O).

A análises por espectroscopia na região do infravermelho foram também realizadas para a TCh, nas mesmas condições utilizadas para a quitosana purificada.

As medidas de SPR foram realizadas usando o equipamento Autolab Springle (Eco Chemie), composto de um prisma e um laser de Hélio/Neônio com emissão em 670 nm. Com base no fenômeno de reflexão interna total atenuada, configuração de Kretschmman, a intensidade da luz refletida do laser no aparato de vidro recoberto com um filme nanométrico de ouro (50 nm) foi medida através de um detector de fotodiodo. O disco de vidro recoberto com ouro foi limpo com solução piranha de ácido sulfúrico (H_2SO_4 - Nuclear, Brasil) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - Nuclear, Brasil) (3:1 H_2SO_4 concentrado: H_2O_2 30% v v⁻¹), seguido de um banho ultrassônico por 10 min em acetona e em álcool isopropílico (Nuclear, Brasil). Os discos foram enxaguados com água deionizada e secos em atmosfera de nitrogênio. A solução aquosa de TCh ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) foi adicionada (50 μL) no disco e a alteração do ângulo de reflexão do laser foi observada ao longo do tempo. O experimento foi realizado a $19,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese das nanopartículas de prata (AgNPs) foi realizada através do método de síntese química (SONG et al., 2009; MI et al., 2015). Para formar AgNPs sem agente estabilizante, uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) (1 mmol L^{-1} em água deionizada) foi adicionada à uma solução de NaBH_4 (2 mmol L^{-1} em água

deionizada) sob purga de N_2 e agitação até a solução ficar amarelada. A razão molar $NaBH_4/AgNO_3$ foi modificada de 1 até 20 para a escolha da melhor condição, conforme Tabela 1.

TABELA 1 – VOLUMES DOS COMPONENTES DAS FORMULAÇÕES DE AgNPs

Razão molar $NaBH_4/AgNO_3$	1	2	5	10	15	20
Volume $AgNO_3$ (1 mmol L^{-1})	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Volume $NaBH_4$ (2 mmol L^{-1})	2,5 mL	5 mL	12,5 mL	25 mL	37,5 mL	50 mL
Volume final	7,5 mL	10 mL	17,5 mL	30 mL	42,5 mL	55 mL

FONTE: A autora (2023).

3.6 ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM QUITOSANA TIOLADA

As nanopartículas de prata estabilizadas com quitosana tiolada (TCh-AgNPs) foram sintetizadas com diferentes concentrações de polímero (0,25 a 1,0 mg mL^{-1} em água deionizada), e diferentes metodologias de incorporação de TCh foram testadas. As dispersões de TCh-AgNPs foram preparadas a partir de concentrações iniciais de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,00 mg mL^{-1} de TCh, conforme Tabela 2. Para as AgNPs sem TCh, um volume de 5 mL de água foi adicionado à preparação para que as concentrações finais fossem equiparáveis.

TABELA 2 – VOLUMES E CONCENTRAÇÕES FINAIS DOS COMPONENTES DAS FORMULAÇÕES DE TCh-AgNPs

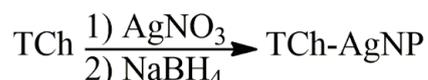
TCh-AgNP	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00
Volume $AgNO_3$ (1 mmol L^{-1})	5 mL				
Volume $NaBH_4$ (2 mmol L^{-1})	25 mL				
Volume TCh (0,25-1,0 mg mL^{-1})	-	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Volume H_2O	5 mL	-	-	-	-
Volume final	35 mL				
[$AgNO_3$] final (mmol L^{-1})	0,143	0,143	0,143	0,143	0,143
[$NaBH_4$] final (mmol L^{-1})	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43
[TCh] final (mg mL^{-1})	-	0,036	0,071	0,107	0,142

FONTE: A autora (2023).

As três metodologias investigadas estão descritas a seguir:

A primeira metodologia (**M1**) (FIGURA 7) foi realizada misturando a solução de AgNO_3 (1 mmol L^{-1} em água deionizada) com a solução de TCh para formar um complexo de coordenação e incorporá-lo na solução de NaBH_4 (2 mmol L^{-1} em água deionizada) para reduzir este complexo.

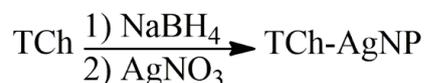
FIGURA 7 – ESQUEMA DE REAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS TCh-AgNPs PELA METODOLOGIA M1



FONTE: A autora (2023).

A metodologia 2 (**M2**) (FIGURA 8) foi realizada pela redução da TCh com solução de NaBH_4 (2 mmol L^{-1} em água deionizada), que cliva as ligações dissulfeto presentes no polímero em grupos sulfidrilas livres e posteriormente adicionando a solução de AgNO_3 (1 mmol L^{-1} em água deionizada) para formar as nanopartículas.

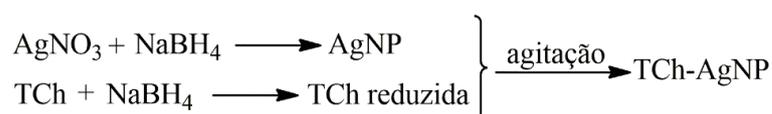
FIGURA 8 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS TCh-AgNPs PELA METODOLOGIA M2



FONTE: A autora (2023).

Na última metodologia, metodologia 3 (**M3**), a TCh foi incorporada após ser reduzida com NaBH_4 (2 mmol L^{-1} em água deionizada) às AgNPs pré-formadas sem agente estabilizador, conforme mostrado na Figura 9.

FIGURA 9 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS TCh-AgNPs PELA METODOLOGIA M3



FONTE: A autora (2023).

Além das metodologias e da concentração do polímero, a temperatura (20 a 70°C) e o tempo de reação (após a incorporação da quitosana tiolada) também foram testados.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs E TCh-AgNPs

As AgNPs e TCh-AgNPs foram caracterizadas por UV-vis, espalhamento dinâmico de luz, e *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA). Além disso, também foi avaliado seu potencial zeta e a capacidade de estabilização do radical ABTS^{•+}. As medições de absorvância foram realizadas em um espectrômetro UV-vis (PerkinElmer Lambda 25), com a varredura do comprimento de onda na faixa de 200 a 700 nm. A determinação de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (ζ) foram realizadas pelo analisador de tamanho Zetasizer Ultra (Malvern, Reino Unido) à 25 °C. Os diâmetros hidrodinâmicos (D_h) foram obtidos com a emissão do laser em 633 nm, ângulo do fotodetector a 175° e foram expressos pela média \pm desvio padrão. Para as determinações de potencial ζ , as amostras foram diluídas 10x em solução aquosa de cloreto de potássio (KCl) a 1 mmol L⁻¹, um eletrólito de referência para fornecer uma linha de base de condutividade para as medições.

As análises de NTA foram realizadas no equipamento NanoSight LM10 (Malvern, Amesbury, UK), equipado com um laser (488 nm), que incide na amostra, que espalha a luz do laser. A câmera capta um vídeo das partículas com base no movimento browniano, as rastreia individualmente e, com base na equação de Stokes-Einstein, permite calcular a distribuição de diâmetro hidrodinâmico das partículas. Foram adquiridos 3 vídeos de 60 segundos por medida e as amostras de AgNPs e TCh-AgNPs foram diluídas 1000 vezes em água deionizada para a análise. O experimento foi realizado no Institut Galien Paris-Saclay, UMR 8612, Université Paris-Saclay (França).

Após estabilização das TCh-AgNPs, a quantidade de polímero aderido às AgNPs foi avaliada através de uma etapa de ultracentrifugação (40 000 rpm/1h/4°C) na Ultracentrífuga Beckman Coulter com rotor NS10E129. Os grupos SH do polímero presentes no sobrenadante foram medidos pelo ensaio de Ellman seguindo a metodologia supracitada. O precipitado foi ressuspenso em água deionizada e o potencial ζ foi determinado.

As análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) foram realizadas em espectrômetro PerkinElmer UATR Two (Massachusetts, EUA) equipado com reflectância total atenuada (ATR), no Institut Galien Paris-Saclay, UMR 8612, Université Paris-Saclay (França). As análises foram realizadas com as amostras

lioofilizadas, com 64 varreduras de acumulação, resolução de 1 cm^{-1} e número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

O ensaio de determinação da estabilização do radical ácido'2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) foi realizado seguindo a metodologia de Thaipong et al. (2006). Foram preparadas uma solução estoque de ABTS ($7,4 \text{ mmol L}^{-1}$ em água deionizada) e uma solução de persulfato de potássio ($2,6 \text{ mmol L}^{-1}$ em água deionizada). As soluções foram misturadas em quantidades iguais para obter o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Após 16h, esta solução foi diluída para obter absorvância de $1,04 \pm 0,03$ unidades. As dispersões de AgNPs, TCh-AgNPs e do polímero TCh ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) foram colocadas sob a solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($50 \mu\text{L}$ de amostra e $200 \mu\text{L}$ de $\text{ABTS}^{\bullet+}$) e a absorvância foi medida a 734 nm . A curva padrão foi obtida entre $6,35$ e 75 mmol L^{-1} em água deionizada de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametacromano- ácido 2-carboxílico). Os resultados foram expressos em mmol L^{-1} equivalentes de Trolox (TE)/g e em porcentagem de descoloração do reagente seguindo a Equação 3:

$$\text{Descoloração (\%)} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{Controle}} - \text{Abs}_{\text{Amostra}}}{\text{Abs}_{\text{Amostra}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde:

$\text{Abs}_{\text{Controle}}$ = Absorvância do controle positivo (vitamina C)

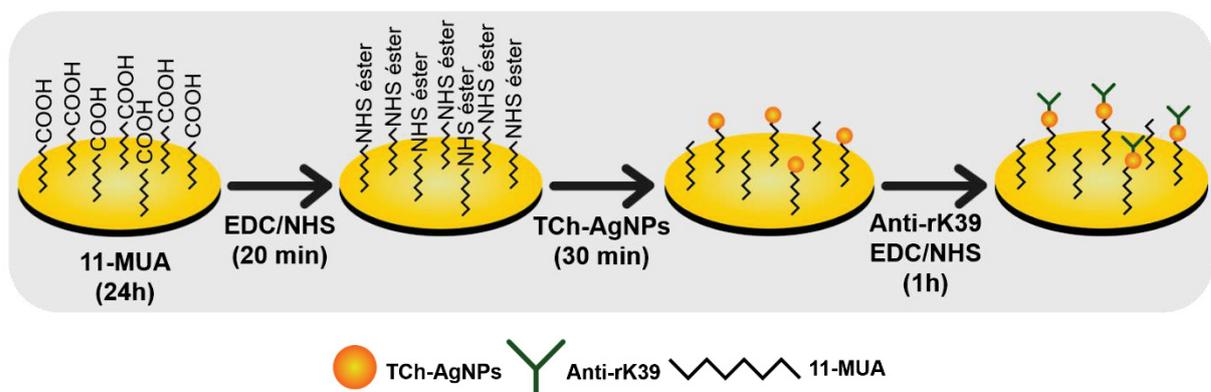
$\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ = Absorvância da amostra

3.8 LIGAÇÃO COVALENTE DOS ANTICORPOS NA SUPERFÍCIE DAS TCh-AgNPs

A ligação covalente do anticorpo monoclonal anti-rK39 na superfície das TCh-AgNPs (TCh-AgNPs@Ac) foi realizada conforme relatado por Jirawutthiwongchai et al., 2014. Foram solubilizadas soluções aquosas de EDC (1 mmol L^{-1} , $100 \mu\text{L}$) e NHS ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $100 \mu\text{L}$) em tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2). Para 1 mL de dispersão final de TCh-AgNPs@Ac, foram colocados $99 \mu\text{L}$ da solução aquosas de EDC e $96 \mu\text{L}$ da solução aquosas de NHS diluídos em tampão quantidade suficiente para (q.s.p) $900 \mu\text{L}$. O anticorpo (solução mãe de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi diluído nesta solução de $900 \mu\text{L}$ em quantidades correspondentes as concentrações finais de 10 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Paralelamente, a dispersão das TCh-AgNPs foi diluída 1:10 em solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2). Após 10 min , a dispersão diluída de TCh-AgNPs foi adicionada ($100 \mu\text{L}$) e agitada a temperatura ambiente.

As medidas de SPR foram realizadas para verificar a ligação entre as nanopartículas e o anticorpo. O disco de vidro recoberto com ouro foi limpo como previamente descrito no item 3.4. A superfície foi modificada através da imersão dos substratos limpos em solução etanoica de ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) (1 mmol L^{-1}) por 24 h a temperatura ambiente. A etapa de ativação dos grupamentos carboxílicos foi realizada pela adição de uma solução aquosa de NHS-EDC ($150:100 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente) por 20 min, para a modificação dos grupamentos carboxílicos terminais, seguido da etapa de lavagem com água deionizada e tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2). A solução de TCh-AgNPs (com $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de TCh em água deionizada – diluídas 10x) foi adicionada ($50 \mu\text{L}$) no disco e a alteração do ângulo de reflexão do laser foi observada por 30 min. Após a ligação, foi realizada uma etapa de lavagem com tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2). Uma solução de anticorpo monoclonal anti-rK39 ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2), NHS-EDC ($150:100 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), foi adicionada ($50 \mu\text{L}$) sobre o disco sensor e a alteração do ângulo de reflexão da luz incidente foi observada até a estabilização por 1h. Por fim, foi retirada a solução de amostra do sistema e $100 \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2) foram adicionados para remover anticorpos fracamente ligados à interface (FIGURA 10). O experimento foi realizado a $17,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

FIGURA 10 - ESQUEMA DE MODIFICAÇÃO DO DISCO DE VIDRO RECOBERTO COM OURO PARA CARACTERIZAR AS ETAPAS DE SÍNTESE DAS TCh-AgNPs@Ac. MODIFICAÇÃO DO OURO COM 11-MUA, ATIVAÇÃO DOS GRUPAMENTOS ÁCIDOS DA SUPERFÍCIE COM EDC/NHS, SEGUIDO DA LIGAÇÃO DAS TCh-AgNPs E A LIGAÇÃO DO ANTI-rK39



LEGENDA: 11-MUA (ácido 11-mercaptoundecanoico), EDC (Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida), NHS (N-hidroxissuccinimida).

FONTE: A autora (2023).

As amostras de TCh-AgNPs@Ac foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil sulfato de sódio (SDS). O gel composto de uma mistura de acrilamida e bisacrilamida a 12% foi utilizado para observar a conjugação do anticorpo à TCh-AgNP e o tampão utilizado foi o Tris HCl (1,5 mol L⁻¹, pH 8.8) com 10% de SDS. As amostras utilizadas foram: a solução aquosa de TCh (0,5 mol L⁻¹), as TCh-AgNPs@Ac contendo o anticorpo na concentração de 20 µg mL⁻¹ e a dispersão de anticorpo livre (20 µg mL⁻¹ em tampão PBS 0,01 mol L⁻¹, pH 7,2). Os valores de massa molar foram determinados usando os respectivos géis pré-moldados NuPAGE®, conforme consta no protocolo do reagente (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2013). O padrão de massa molar utilizado foi o PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Após a corrida, o gel foi corado com solução aquosa de azul brilhante de Coomassie para visualização dos padrões.

O cálculo de número de moléculas de anti-rK39 por nanopartícula, seguindo as Equações 4 e 5 (TAYLOR et al., 1987):

$$\text{Moléculas de anticorpo por mL} = \frac{\text{Concentração do anticorpo}}{\text{Massa molar}} \times N_A \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

Concentração do anticorpo = 10, 20, 30, 40 ou 50 x10⁻⁶ g mL⁻¹

Massa molar do anticorpo = 1 x 10⁵ g mol⁻¹

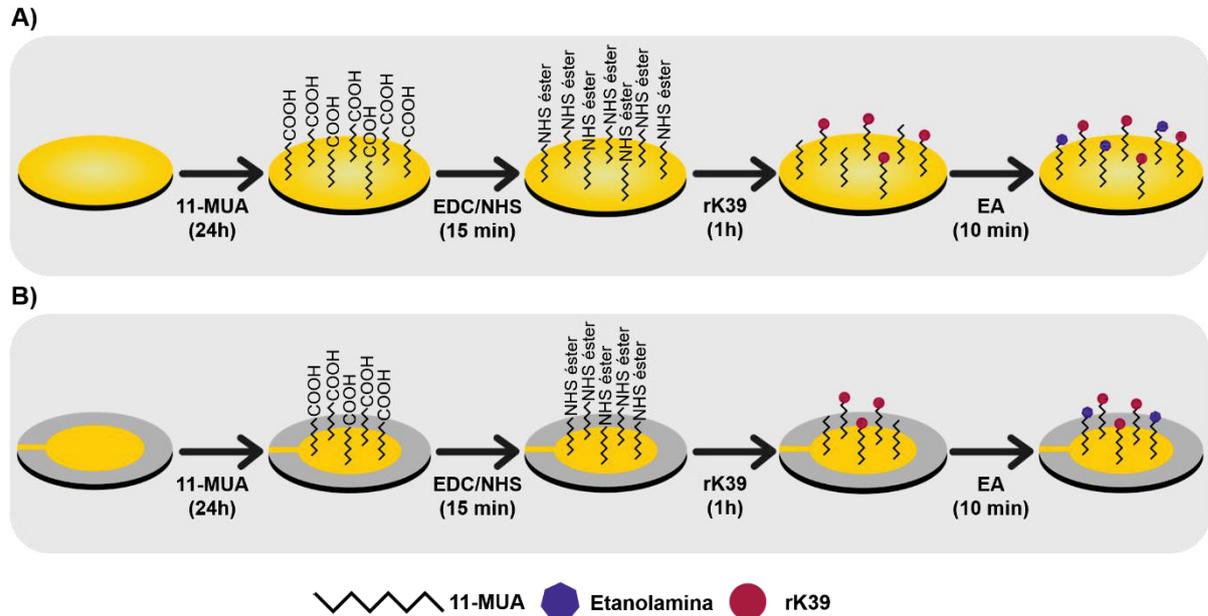
N_A = Número de Avogadro (6,02x10²³ mol⁻¹)

$$\text{Número de anti - rK39 por nanopartícula} = \frac{\text{Moléculas de anticorpo por mL}}{\text{Nanopartículas por mL}} \quad (\text{Equação 5})$$

3.9 CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES

Para estudar a interação antígeno-anticorpo entre a proteína rK39 (antígeno da LV) e o anti-rK39 (seja ele ligado às nanopartículas na forma de TCh-AgNPs@Ac ou na forma livre), a construção do imunossensor foi realizada de acordo com as seguintes etapas: funcionalização, ativação, imobilização, bloqueio e detecção (FIGURA 11). Esta etapa foi realizada tanto para o disco do SPR quanto para os cristais da Microbalança de Cristal de Quartzo (do inglês *Quartz Crystal Microbalance* - QCM).

FIGURA 11 – ESQUEMA DE MODIFICAÇÃO DOS (A) DISCOS DE VIDRO RECOBERTO COM OURO E (B) CRISTAIS DE QUARTZO RECOBERTOS COM OURO PARA RECEBER A PROTEÍNA rK39



LEGENDA: 11-MUA (ácido 11-mercaptoundecanoico), EDC (Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida), NHS (N-hidroxissuccinimida) e EA (etanolamina).

FONTE: A autora (2023).

A funcionalização e formação da SAM foi realizada por imersão dos substratos limpos em solução etanólica de ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) (1 mmol L^{-1}) por 24 h a temperatura ambiente a fim de obter a interação. Após este período, a superfície foi lavada com etanol, seguido de lavagem com água e seca sob o fluxo de gás nitrogênio (N_2) puro. A etapa de ativação foi realizada pela adição de uma solução aquosa de NHS-EDC ($150:100 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente) por 15 min, para a modificação dos grupamentos carboxílicos terminais, seguido da etapa de lavagem com água e solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2).

Em seguida, os substratos previamente ativados foram imersos por 1h em uma solução de proteína recombinante rK39 para imobilização da proteína via ligação covalente, onde foi observada a alteração do ângulo de reflexão do laser ao longo do tempo. Após a imobilização, foi realizada uma etapa de lavagem com uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2) e os aparatos foram submetidos ao processo de bloqueio dos sítios reativos residuais, através da imersão em solução de

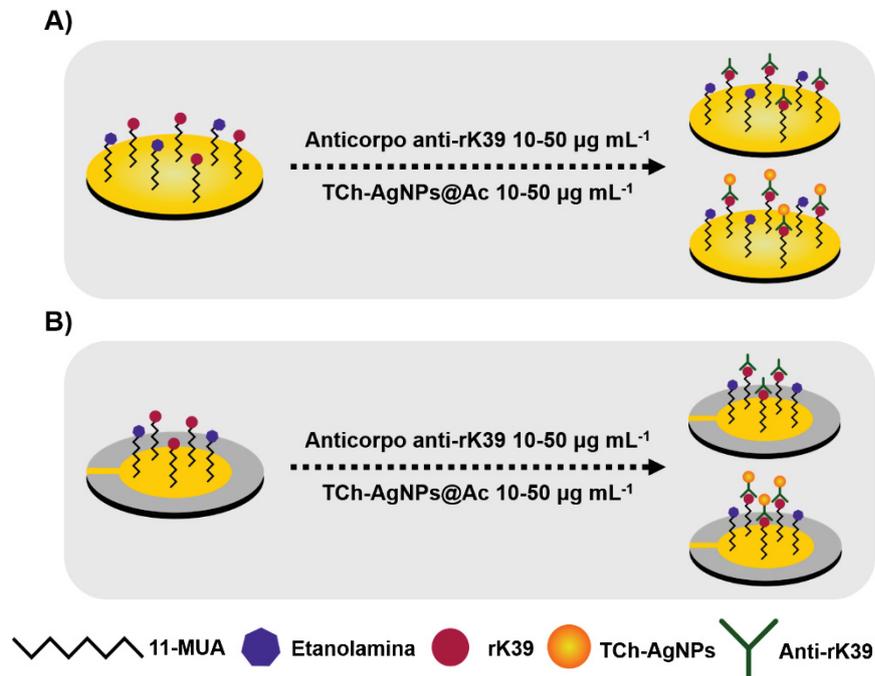
etanolamina (EA) (1 mmol L^{-1} em tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) por 10 min com posterior enxágue com uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2).

Para confirmar a modificação após cada etapa, os substratos foram secos em estufa ($40 \text{ }^\circ\text{C}$) e submetidos a análise de ângulo de contato. As medidas foram realizadas com água purificada e medidas a $20,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$. O ângulo de contato na superfície do aparato foi medido pelo método da gota séssil, onde foram gotejados $5 \mu\text{L}$ de água purificada nos discos. As análises foram realizadas em um tensiômetro DataPhysics Instruments GmbH Contact Angle System OCA15+ (Alemanha), utilizando uma seringa Hamilton de $500 \mu\text{L}$ e agulha com diâmetro externo de $1,65 \text{ mm}$ e comprimento de $38,1 \text{ mm}$. Foram capturadas imagens das gotas formadas e utilizando o *software* SCA20 foi traçado manualmente o perfil da gota obtendo os ângulos de contato dos lados esquerdo e direito de cada gota.

A partir da construção do biossensor, o imunodiagnóstico da proteína rK39 foi realizado por SPR e QCM. A análise de SPR iniciou-se pela adição de uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2) ($100 \mu\text{L}$) até a estabilização da linha de base. Após este período, a dispersão de anticorpo monoclonal anti-rK39 ou das TCh-AgNPs@Ac foram adicionadas ($50 \mu\text{L}$) no disco e a alteração do ângulo de reflexão do laser foi observado ao longo do tempo até a estabilização. Após a detecção, foi retirada a solução de amostra do sistema e $100 \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2) foi adicionada para remover qualquer antígeno não específico ligado (FIGURA 12 - A). O experimento foi realizado a $20,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

A análise de QCM (FIGURA 12 - B) foi iniciada com a injeção de uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2) até a estabilização da linha base da frequência. Posteriormente, a solução de anticorpo monoclonal anti-rK39 ou a dispersão das TCh-AgNPs@Ac foram adicionadas (1 mL) em diferentes concentrações ($10, 20, 30, 40$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), e a variação de oscilação do cristal foi observada ao longo do tempo. Após a detecção, o sistema foi lavado com uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2) para remover qualquer anticorpo não específico ligado. Todas as injeções foram realizadas no fluxo celular com vazão de $15 \mu\text{L min}^{-1}$. O experimento foi realizado a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

FIGURA 12 – ESQUEMA DE DETECÇÃO DO ANTICORPO ANTI-rK39 E DAS TCh-AgNPs@Ac PELA METODOLOGIA DE (A) SPR E (B) QCM

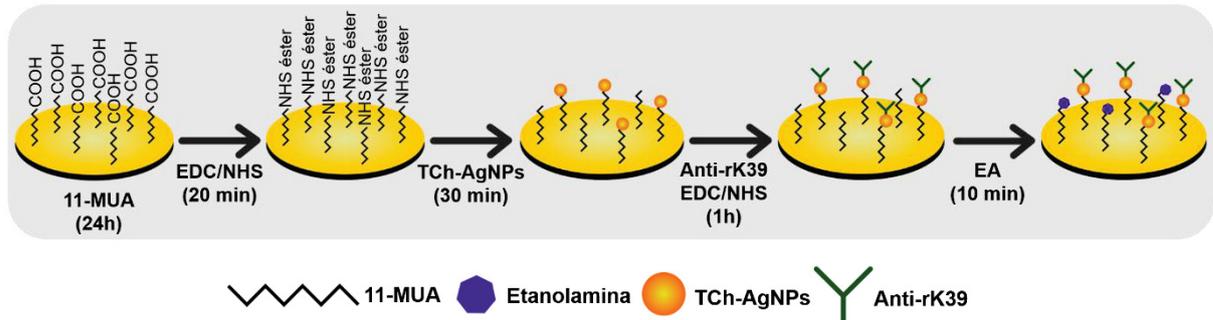


FONTE: A autora (2023).

3.10 IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA rK39 EM SORO

Após observar a ligação antígeno-anticorpo mantendo a proteína rK39 no disco, o experimento foi realizado de maneira oposta para simular a detecção da proteína rK39 livre em soro. Para tal, as TCh-AgNPs@Ac foram ligadas na superfície do disco de SPR. O disco foi preparado conforme item 3.8 (Ancoragem dos anticorpos na superfície das TCh-AgNPs), a partir da modificação do ouro com 11-MUA, ativação dos grupamentos ácidos da superfície com EDC/NHS, ancoragem das partículas TCh-AgNPs, nova modificação da superfície com uma solução de EDC/NHS/Anti-rK39 (150:100 mmol L⁻¹/20 µg mL⁻¹) e bloqueio com etanolamina (1 mmol L⁻¹ – em uma solução aquosa de tampão PBS 0,01 mol L⁻¹, pH 7,2) por 10 minutos (FIGURA 13).

FIGURA 13 - ESQUEMA DE MODIFICAÇÃO DO DISCO DE VIDRO RECOBERTO COM OURO PARA IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA rK39. MODIFICAÇÃO DO OURO COM 11-MUA, ATIVAÇÃO DOS GRUPAMENTOS ÁCIDOS DA SUPERFÍCIE COM EDC/NHS, SEGUIDO DA LIGAÇÃO DAS TCh-AgNPs E A LIGAÇÃO DO ANTI-rK39, SEGUIDO DA ETAPA DE BLOQUEIO COM EA



LEGENDA: 11-MUA (ácido 11-mercaptoundecanoico), EDC (Hidroclorato de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida), NHS (N-hidroxisuccinimida), e EA (etanolamina).

FONTE: A autora (2023).

No equipamento, foi colocado o disco preparado conforme item 3.8 (Ancoragem dos anticorpos na superfície das TCh-AgNPs) e a análise foi iniciada com a adição de uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2) ($100 \mu\text{L}$) até a estabilização da linha base. Após este período, uma solução mãe de soro humano (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foi manualmente contaminada com a proteína rK39 ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), diluída conforme Tabela 3 e as soluções foram adicionadas ($50 \mu\text{L}$) no disco. A alteração do ângulo de reflexão do laser foi observada ao longo do tempo. Após a detecção, foi retirada a solução de amostra do sistema e $100 \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,2) foi adicionada para remover qualquer antígeno não específico ligado. O experimento foi realizado a $20,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

TABELA 3 – DILUIÇÃO DO SORO HUMANO MANUALMENTE CONTAMINADO COM A PROTEÍNA rK39 E A RESPECTIVA CONCENTRAÇÃO FINAL DA PROTEÍNA rK39

DILUIÇÃO DO SORO	CONCENTRAÇÃO FINAL DE rK39
1:100	$0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$
1:200	$0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$
1:400	$0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
1:800	$0,063 \mu\text{g mL}^{-1}$
1:1600	$0,031 \mu\text{g mL}^{-1}$
1:3200	$0,015 \mu\text{g mL}^{-1}$

FONTE: A autora (2023).

3.11 CULTIVO CELULAR

A cultura de macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foi estabelecida usando o meio RPMI suplementado com 10% (v v⁻¹) de soro fetal bovino (Gibco™, Brasil), 2 mmol L⁻¹ de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 2 mmol L⁻¹ de HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A cultura foi incubada a 37 °C com 5% de dióxido de carbono (CO₂). As passagens para meio fresco foram realizadas a cada dois dias para manter a viabilidade e o crescimento celular.

A cultura de parasitas *Leishmania infantum* (MHOM/FR/78/LEM75) foi iniciada com o cultivo de promastigotas em meio bifásico. A fase sólida foi ágar BHI (Infusão Cérebro e Coração) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), pH 7,2, suplementado com 10% (v v⁻¹) sangue de coelho e a fase líquida foi caldo BHI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 26 °C. O cultivo de rotina foi obtido mantendo os parasitas a 26 °C em meio RPMI pH 7,2 suplementado com 10% (v v⁻¹) de soro fetal bovino, 2 mmol L⁻¹ de L-glutamina e 2 mmol L⁻¹ de solução de aminoácidos não essenciais 1x MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As promastigotas foram subpassadas para meio fresco a cada quatro dias para manter seu crescimento e viabilidade.

Os experimentos de citotoxicidade em macrófagos, atividade hemolítica, ensaio cometa, atividade leishmanicida nas formas promastigotas e amastigotas e infecção foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná.

O estudo de atividade hemolítica foi realizado de acordo com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Brasil (CEP-CONEP) e a Resolução CNS 196/96. A aprovação foi concedida pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná, processo n° 3.954.835.

Para todos os experimentos, as amostras iniciais utilizadas foram a solução aquosa de TCh (0,5 mg mL⁻¹), e as dispersões de AgNPs, TCh-AgNPs e TCh-AgNP@Ac com 20 µg mL⁻¹ de anticorpo ancorado.

3.11.1 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada para avaliar a capacidade da formulação em ser aplicada através da via intravenosa. Assim, o ensaio foi realizado misturando

80 μL de uma suspensão de glóbulos vermelhos humanos frescos (5% v v⁻¹ em uma solução aquosa de tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ – pH 7,2) com 20 μL de diferentes concentrações das amostras (2, 2x10⁻¹, 2x10⁻², 2x10⁻³, 1x10⁻³, 2x10⁻⁴ $\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubada a 37°C com 5% de CO₂ por quatro horas. A suspensão foi centrifugada (10³ g, 10 min) e o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços, onde a lise celular foi quantificada pela medida da absorbância nos comprimentos de onda de 540 e 575 nm. Como controle positivo de dano hemolítico, uma solução de Tween 20 (Synth, Brasil) (10% v v⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2) foi utilizada, e como controle negativo, as hemácias sem tratamento.

A partir deste procedimento, foi calculado a porcentagem de hemólise e o índice de desnaturação da oxihemoglobina, considerando a desnaturação proteica como sendo a perda da atividade biológica da hemoglobina. A porcentagem de hemólise foi determinada usando a Equação 6. As absorbâncias obtidas foram lidas em 540 nm.

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Amostra}} - \text{Abs}_{\text{Controle negativo}})}{(\text{Abs}_{\text{Controle positivo}} - \text{Abs}_{\text{Controle negativo}})} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

O índice de desnaturação da oxihemoglobina (ID) também foi determinado, considerando a Equação 7:

$$\text{Índice de desnaturação (\%)} = 100 \times \frac{(R1 - Ri)}{(R1 - R2)} \quad (\text{Equação 7})$$

onde:

R1 = razão da oxihemoglobina (1,05)

R2 = razão do controle positivo

Ri = razão da amostra teste

O valor de absorbância medido no comprimento de onda de 575 nm foi dividido pelo valor obtido no comprimento de onda de 540 nm para obter a razão (R).

3.11.2 Citotoxicidade em macrófagos

A avaliação da citotoxicidade foi realizada em placas de 96 poços utilizando o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

Foram incubados 1×10^5 macrófagos/poço em 100 μL de meio RPMI 1640 suplementado a 37°C e 5% de CO_2 por 4 horas para adesão celular. As células não aderentes foram removidas por lavagem com o meio RPMI. As amostras foram diluídas no meio RPMI em diferentes concentrações (2, 2×10^{-1} , 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 2×10^{-4} $\mu\text{g mL}^{-1}$). O cultivo foi incubado a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas. Após este período, foi realizada a adição do MTT (5 mg mL^{-1} em PBS 0,1 mol L^{-1} , pH 7,2) e novamente incubada nas mesmas condições durante três horas. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 550 nm usando um leitor de placas Biotek PowerWave XS. Como controle negativo foram utilizados macrófagos sem tratamento.

3.11.3 Ensaio cometa

Os danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) de leucócitos foram medidos usando eletroforese em gel de célula única alcalina, de acordo com a metodologia de Palus et al., 1999, com modificações. As lâminas foram preparadas depositando 100 μL de agarose a 0,5 % (m v^{-1}) em uma solução aquosa de tampão PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} . A solução foi coberta com lamínulas e armazenadas em geladeira para geleificação da agarose.

Os leucócitos foram cultivados na concentração de 10^6 células/mL em meio RPMI 1640. Uma mistura contendo 100 μL de suspensão de células e 100 μL das amostras em diferentes concentrações (2, 2×10^{-1} , 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 2×10^{-4} $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada. Esta solução foi adicionada à 100 μL de agarose de baixo ponto de fusão 2% (m v^{-1}) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e, após remover cuidadosamente as lamínulas, esta solução de células e amostras foi adicionada sobre a camada de agarose previamente preparada e mantida em temperatura baixa para solidificação.

Após este período, as lâminas foram imersas em uma solução de lise recém preparada, composta de 2,5 mol L^{-1} de NaCl, 100 mmol L^{-1} de EDTA sódico, 10 mmol L^{-1} de Tris-básico (pH 10) e 1% (v v^{-1}) de Triton X-100. As lâminas foram incubadas por 30 min a 37°C . Após este período, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal, que foi preenchida com uma solução de eletroforese contendo uma solução aquosa de EDTA sódico (10 mmol L^{-1}) e uma solução aquosa de tampão de NaOH (300 mmol L^{-1} , pH 10) para cobrir as lâminas.

A eletroforese foi realizada com a aplicação de uma tensão de 25 V e corrente elétrica de 300 mA por 30 min. Após a eletroforese, as lâminas foram posicionadas horizontalmente e foi adicionado uma solução aquosa de tampão Tris 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,5) gota a gota para neutralizar o excesso alcalino. Este processo foi repetido 3 vezes.

As lâminas foram coradas com 100 µL de fluoróforo Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, Brasil) e incubadas por 5 min a temperatura ambiente, protegido da luz. A visualização das lâminas foi realizada no microscópio Olympus BX51 (Olympus System Microscopes) equipado com câmera Olympus (DP72). As imagens foram capturadas no software Cell[^]F (2008, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

Para avaliar o nível de danos ao DNA, 100 células foram avaliadas com ampliação de 40x. A quantificação dos danos foi baseada na classificação visual das células em cinco categorias chamadas de “cometas”, de acordo com o comprimento da cauda: Tipo 0 para nenhum dano, Tipo 1 para danos de baixo nível, Tipo 2 para danos de nível médio, Tipo 3 para danos de alto nível e Tipo 4 para danos completos. Os leucócitos sem tratamento foram utilizados como controle negativo de danos e a anfotericina B lipossoma (Ambissome®) foi utilizada como comparativo para avaliar os danos causados pelas amostras.

3.11.4 Atividade anti-Leishmania para formas promastigotas

Promastigotas na fase de crescimento logarítmico foram cultivados em tubos a 1x10⁵ parasitas/poço contendo 1 mL de meio RPMI suplementado com diferentes concentrações das amostras (2, 2x10⁻¹, 2x10⁻², 2x10⁻³, 1x10⁻³, 2x10⁻⁴ µg mL⁻¹). Os tubos foram incubados por 24 h em incubadora de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) a 26°C para promastigotas. A cultura foi centrifugada (10³ g, 10 min), ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI suplementado e novamente incubados por 24 h em B.O.D a 26°C. A anfotericina B lipossoma (Ambissome®) foi utilizada como comparativo para avaliar a resposta obtida pelas amostras e como controle negativo foram utilizados promastigotas sem tratamento. A atividade anti-Leishmania foi determinada usando a Equação 8:

$$\text{Atividade anti - Leishmania} = \frac{\text{número de } L.\text{infantum na amostra}}{\text{número de } L.\text{infantum no controle negativo}} \times 100 \text{ (Equação 8)}$$

3.11.5 Infecção experimental de macrófagos

Para avaliar a capacidade de tratamento da infecção dos macrófagos com *Leishmania*, foi realizada a adesão de macrófagos em lamínulas estéreis de 13-15 mm de diâmetro em placas de 24 poços. Sob as lamínulas, foram colocados os macrófagos (10^5 células/poço) em 500 μ L de meio RPMI suplementado a 37°C e 5% CO₂ por 4 h para adesão celular. Após este período, os macrófagos não aderentes foram removidos por lavagem com meio e as células aderidas foram infectadas com 5×10^6 de promastigotas de *L. infantum* na fase estacionária, na proporção de 10:1 (10 parasitas por macrófago). Cada poço foi lavado suavemente 4 h após a infecção, seguido do tratamento das culturas com diversas concentrações de TCh-AgNPs e TCh-AgNP@Ac com 20 μ g mL⁻¹ de anticorpo ancorado (2, 2×10^{-1} , 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , 2×10^{-4} μ g mL⁻¹) e incubação a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio foi retirado, cada poço foi lavado e o meio RPMI foi repostado, sendo deixado por 24 h.

Após este tempo, o meio foi retirado e as lamínulas foram fixadas com metanol P.A por 10 min. A marcação com o fluoróforo foi realizada com o fluoróforo Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, Brasil). A visualização das lâminas foi realizada no microscópio Olympus BX51 (Olympus System Microscopes) equipado com câmera Olympus (DP72). As imagens foram capturadas no software Cell[^]F (2008, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

Para determinar a taxa de infecção parasitária, foi contabilizado o número de macrófagos contaminados com formas amastigotas em 1000 macrófagos. Assim, o número de células infectadas foi dividido pelo número total de macrófagos para obter a porcentagem de macrófagos contaminados.

A anfotericina B lipossoma (Ambissome®) foi utilizada como comparativo para avaliar a resposta obtida pelas amostras e como controle negativo foram utilizados macrófagos contaminados sem tratamento.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com GraphPad Prism 8, utilizando ANOVA bidirecional e teste de Tukey ($p < 0,05$ foi considerado significativo) em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

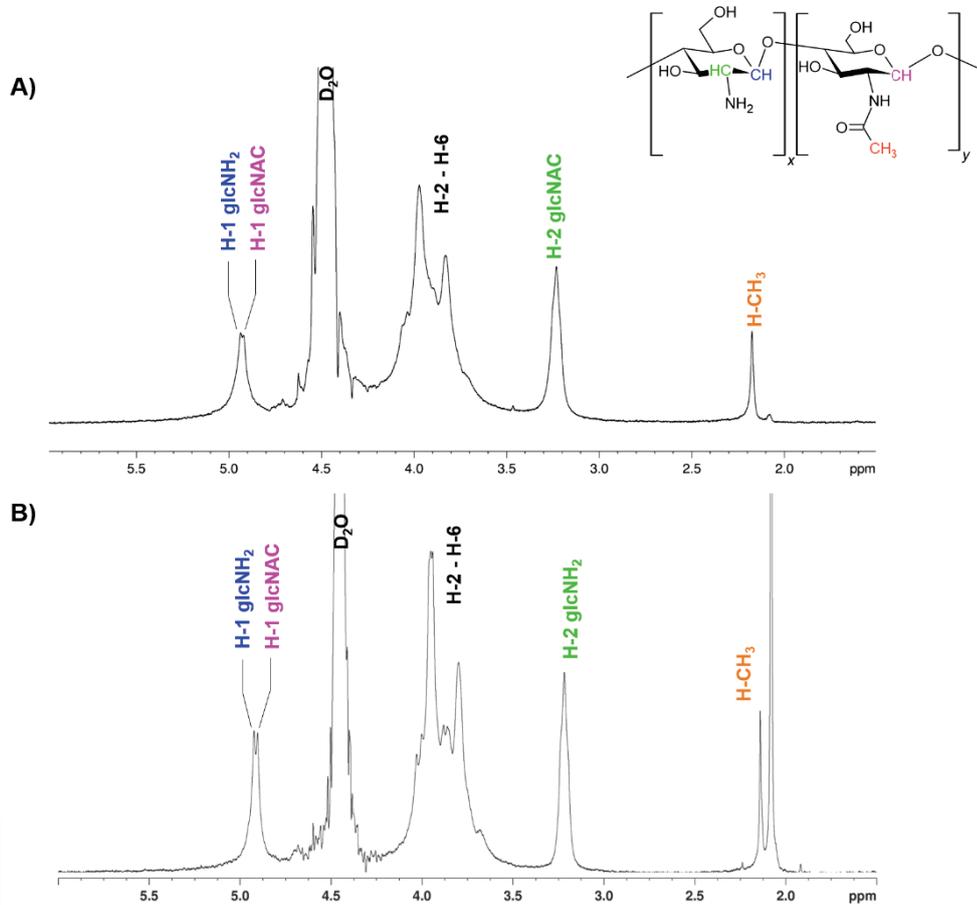
4.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

As propriedades físico-químicas da quitosana são diretamente dependentes da sua massa molar e grau de desacetilação. A fração molar das unidades repetidas N-acetiladas é definida como o grau de acetilação (GA), enquanto a porcentagem das unidades repetidas de β -D-N-acetilglucosamina é definida como o grau de desacetilação (GD). O termo 'quitosana' é usado quando o grau de desacetilação da macromolécula é maior que 50%, e a maioria das quitosanas comerciais apresenta valores de GD entre 70% - 90% (LAVERTU et al., 2003; RINAUDO, 2006; KOU et al., 2021).

Após as etapas de purificação da quitosana, o rendimento foi de 93,8%. Os espectros de RMN de hidrogênio (RMN ^1H) da quitosana bruta e da quitosana purificada estão apresentados na Figura 14.

Os dados espectrais da quitosana bruta mostraram deslocamentos químicos (δ) entre 3,23 e 4,03 ppm correspondendo aos sinais sobrepostos atribuídos às unidades H-2, 3, 4, 5 e 6 de β -D-glucosamina e β -D-N-acetilglucosamina. Os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios da metila ($-\text{CH}_3$) dos grupos acetil ligados a unidades de β -D-N-acetilglucosamina podem ser observados a 2,17 ppm (TABELA 4). Em relação aos dados espectrais da quitosana após dois ciclos de purificação são similares ao da quitosana bruta. Os deslocamentos químicos (δ) presentes entre 3,22 e 4,02 ppm são correspondentes aos H-2, 3, 4, 5 e 6 de unidades de β -D-glucosamina e em 2,14 ppm referentes aos hidrogênios de $-\text{CH}_3$ ligados a unidades de β -D-N-acetilglucosamina (TABELA 4).

FIGURA 14 – ESPECTRO DE RMN DE HIDROGÊNIO (RMN ^1H) PARA (A) QUITOSANA BRUTA E (B) PURIFICADA COM DOIS CICLOS DE PURIFICAÇÃO EM D_2O E ÁCIDO ACÉTICO DEUTERADO (100:2 v v $^{-1}$), A 70 °C, 400 MHz. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)



LEGENDA: H-1, H-2, H-6 (hidrogênio ligado ao carbono 1, 2 e 6), D $_2$ O (água deuterada), glcNH $_2$ (porção β -D-N-acetilglucosamina), glcNAC (porção β -D-glucosamina).

FONTE: A autora (2023).

TABELA 4 – ATRIBUIÇÕES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS ANÁLISES DE RMN DE HIDROGÊNIO (RMN ^1H) DA QUITOSANA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)

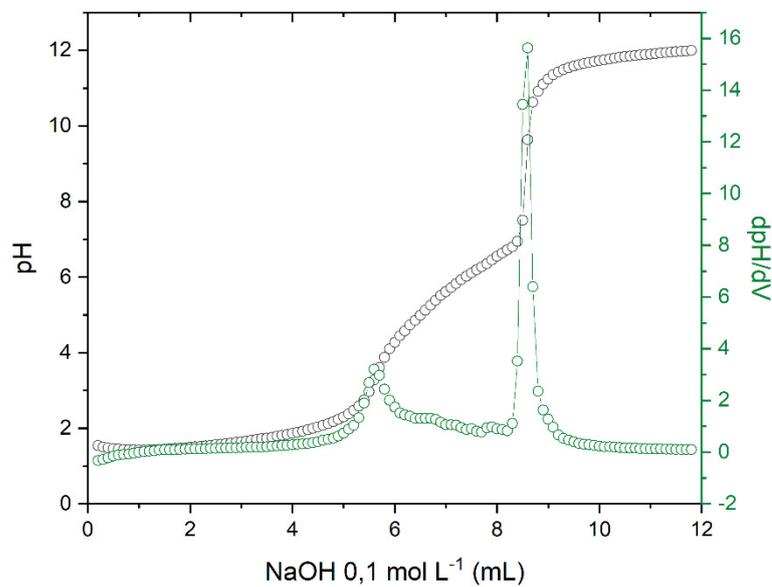
Posição	Bruta	2 ^a Purificação
glcNH $_2$	^1H (δ)	^1H (δ)
H-1	4,94	4,92
H-2	3,23	3,22
H-3	3,83	3,80
H-4	3,88	3,87
H-5	3,97	3,95
H-6	4,03	4,02
glcNAC	^1H (δ)	^1H (δ)
CH $_3$	2,17	2,14
H-1	4,92	4,90

LEGENDA: H-1, (...), H-6 (hidrogênio ligado ao carbono 1 a 6), glcNH $_2$ (porção β -D-glucosamina), glcNAC (porção β -D-N-acetilglucosamina).

FONTE: A autora (2023).

A quantificação do GD foi realizada comparativamente com a quitosana bruta e após purificação. Os valores de GD foram 76,9% para quitosana bruta e 90,6% para quitosana purificada, através da titulação potenciométrica (FIGURA 15) e 90,8% para quitosana bruta e 90,1% para quitosana purificada, calculados pelos dados do RMN, corroborando com os dados em literatura (JACUMAZO et al., 2020, 2023).

FIGURA 15 - PRIMEIRA DERIVADA (dpH/dV) CALCULADA A PARTIR DA TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA QUITOSANA PURIFICADA COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,1 mol L⁻¹



FONTE: A autora (2023).

Os espectros de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR) da quitosana bruta e purificada foram realizados para verificar as funções orgânicas presentes no polímero. As atribuições das bandas estão na Tabela 5.

TABELA 5 - ATRIBUIÇÕES DE BANDAS DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA A QUITOSANA BRUTA E QUITOSANA PURIFICADA COM UM (1ª PURIFICAÇÃO) E DOIS (2ª PURIFICAÇÃO) CICLOS DE PURIFICAÇÃO

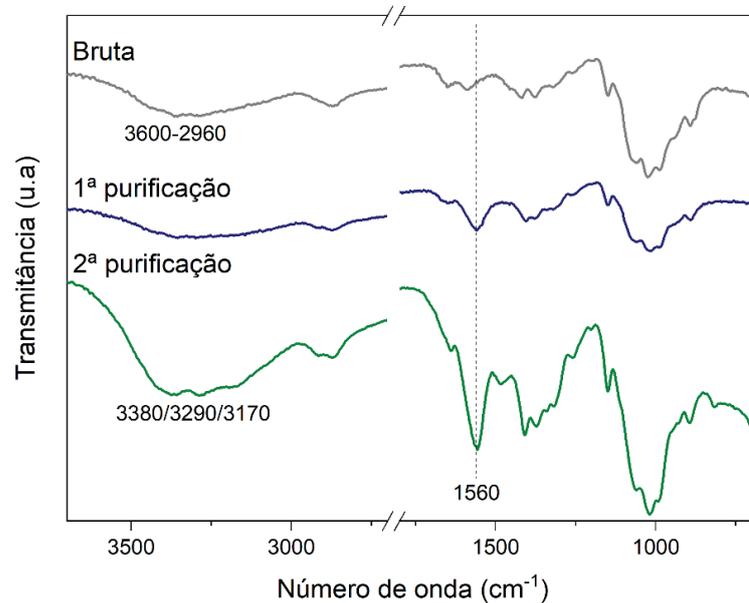
Número de onda (cm ⁻¹)			Atribuição
Bruta	1ª purificação	2ª purificação	
3600-2970 (F/l)	3600-2970 (F/l)	3382+3290+3169 (F/l)	Deformação axial de N-H de amina primária + Deformação axial de O-H com ligação de hidrogênio
2870 (f)	2870 (f)	2870 (F)	Sobreposição de bandas de deformação axial de C-H + deformação axial de O-H
1650 (f)	1640 (f)	1640 (f)	Deformação axial de C=O de amida primária
1590 (f)	1560 (m)	1560 (F)	Deformação axial assimétrica e simétrica de N-H
1417 (f)	1405 (f)	1405 (m)	Deformação axial de C-N de amina primária
1062 (o)	1062 (o)	1062 (o)	Vibrações da ligação C-O-C que unifica as unidades do esqueleto de glucosamina

* F = forte; f = fraca, m = média, o = ombro e l = larga

FONTE: A autora (2023).

A Figura 16 mostra o espectro de FTIR-ATR das amostras e as seguintes bandas podem ser destacadas: na região de 3600-2960 cm⁻¹, referente à deformação axial de O-H com ligação de hidrogênio sobrepondo a deformação axial de N-H de amina primária. Estas bandas são mais resolvidas na região de 3380, 3290 e 3170 cm⁻¹ para quitosana submetida a dois ciclos de purificação. Na região de 1560 cm⁻¹, é possível notar um aumento na intensidade da banda para a amostra de quitosana purificada, característica da deformação axial assimétrica e simétrica do N-H (SILVERSTEIN et al., 2005).

FIGURA 16 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA A QUITOSANA BRUTA E QUITOSANA PURIFICADA COM UM (1ª PURIFICAÇÃO) E DOIS (2ª PURIFICAÇÃO) CICLOS DE PURIFICAÇÃO



FONTE: A autora (2023).

O perfil de eluição da quitosana purificada na cromatografia de exclusão por tamanho determinado pelos detectores de índice de refração (RI), dispersão de luz em ângulo reto (RALS) e dispersão de luz de baixo ângulo (LALS) está apresentado na Figura 17. Os valores de massa molar média ponderal (M_w), distância média-quadrática entre monômeros em uma dada conformação e o centro de massa do polímero ($\langle S^2 \rangle^{1/2}$), relação da massa molar ponderal média com a massa molar numérica média, chamado de índice de dispersão ($D = M_w/M_n$), viscosidade intrínseca $[\eta]$, coeficiente de Mark-Houwink (α) e concentração crítica (c^*) para quitosana purificada são apresentados na (TABELA 6).

Usando o incremento do índice de refração (dn/dc) como $0,189 \text{ mL g}^{-1}$ (WANG et al., 1991), foi obtida a correlação entre a massa molar viscosimétrica média e a viscosidade intrínseca da solução polimérica, chamado de coeficiente α da equação de Mark-Houwink, no valor de 0,6, indicando uma conformação com estrutura aleatória (*random coil*) na solução utilizada como solvente/eluente e na temperatura do experimento (MASUELLI, 2014). A concentração crítica (c^*) foi estimada usando a Equação 9:

$$c^* = \left(\frac{M_w}{\frac{4}{3}\pi \cdot R_g^3 \cdot N_A} \right) \quad (\text{Equação 9})$$

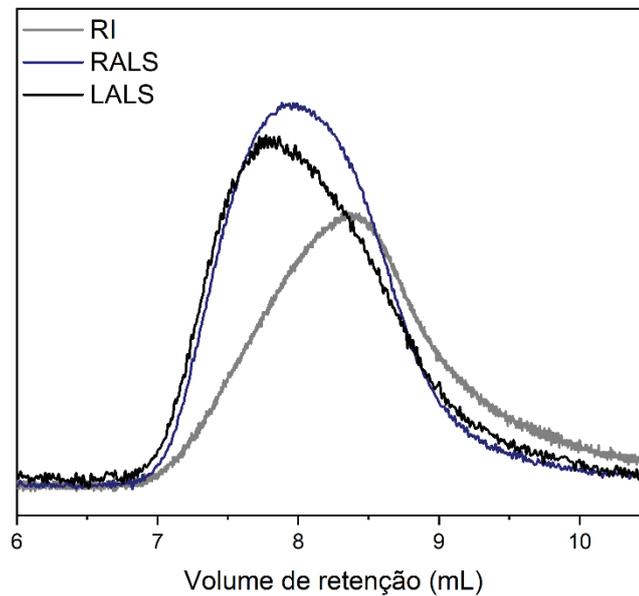
onde:

M_w = massa molar média ponderal;

R_g = raio de giro;

N_A = número de Avogadro

FIGURA 17 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA QUITOSANA PURIFICADA ATRAVÉS DE UMA COLUNA SHODEX OHPACK SB-806M HQ USANDO OS DETECTORES RALS, LALS E RI. TAMPÃO DE ACETATO DE SÓDIO 0,1 M (pH 4,6) E 0,02% (m v⁻¹) NaN₃ COMO FASE MÓVEL, A 0,4 mL min⁻¹ A 40 °C



FONTE: A autora (2023).

O valor de c^* , que estabelece o limite do regime diluído, foi de 3,18 mg mL⁻¹, ou seja, a quitosana deve se comportar em regime diluído até a concentração determinada, indicando que a amostra estava em regime diluído durante a caracterização cromatográfica (DOBRYNIN et al., 1995).

TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA QUITOSANA PURIFICADA

Parâmetros	Quitosana purificada
M_w (10^5 g mol ⁻¹)	1,90
$\langle S^2 \rangle^{1/2}$ (nm)	29,10
$D = M_w/M_n$	1,50
$[\eta]$ (dL g ⁻¹)	8,70
α	0,60
c^* (mg mL ⁻¹)	3,18

FONTE: A autora (2023).

As atribuições das bandas por FTIR-ATR, os deslocamentos químicos observados por RMN e a massa molar média ponderal obtida por SEC confirmaram a estrutura da quitosana, assim como a determinação do GD acima de 50%, permitindo que os próximos passos fossem desenvolvidos. Para continuidade dos experimentos, foi utilizada a quitosana purificada após dois ciclos de purificação.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA TIOLADA

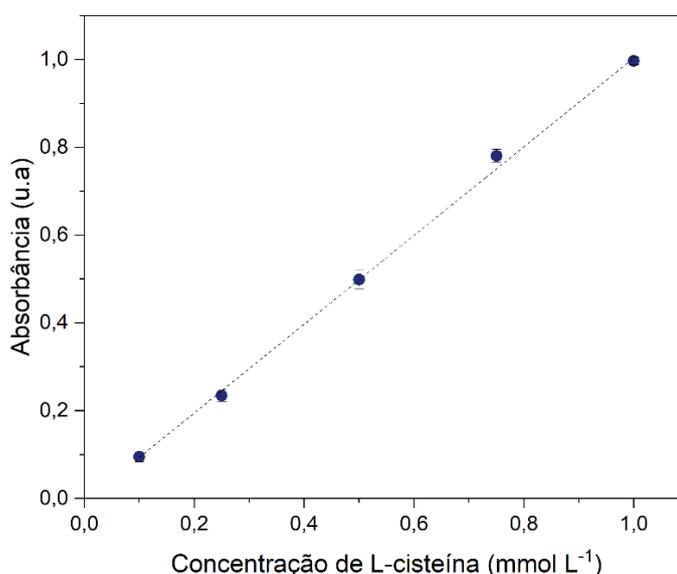
Neste estudo, a modificação de quitosana foi realizada por uma reação com MPA mediada por EDC-NHS (BERNKOP-SCHNÜRCH, 2005; KO et al., 2013). O EDC é uma molécula que reage com grupamentos carboxilas para formar um intermediário instável reativo com grupamentos amino. Caso este intermediário formado não esteja na presença de alguma amina, há a hidrólise e a regeneração do grupo carboxila. Na presença do NHS, o EDC é utilizado na conversão de grupos ácido carboxílicos (neste caso, do MPA) em grupos amida, devido à estabilização do intermediário reativo pelo NHS (pela formação de um éster de NHS reativo com amina), acoplando os três carbonos e o SH terminal do MPA na estrutura da quitosana (BART et al., 2009).

A protonação dos grupos amino da quitosana gera repulsões eletrostáticas entre os segmentos das cadeias poliméricas, permitindo a solvatação das cadeias e sua posterior solubilização e expansão. A dissolução em pH neutro só ocorre com uma pré-etapa de dissolução em meio ácido para protonar os grupos amina, para então ter seu pH ajustado pela adição de uma base sem causar precipitação até o pK_a do grupo amino (RINAUDO et al., 1999a, 1999b). Desta forma, a modificação destes

grupamentos amino com a inserção dos grupamentos sulfidril aumentam a solubilidade em pH neutro, fazendo com que esta quitosana tiolada seja solúvel em soluções aquosas.

Para quantificar a presença de grupamentos SH no polímero modificado, foi realizada a quantificação através do ensaio de Ellman com a utilização de uma curva analítica de cisteína. A curva analítica obteve um coeficiente de determinação (R^2) de 0,998 e equação da reta: $\text{absorbância} = -0,01 + 1,01 \times [\text{mmol L}^{-1}]$. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados 3,3 e 10 s/S, respectivamente, onde s é o desvio padrão da resposta e S é a inclinação da curva de calibração. Os valores obtidos foram 0,065 e 0,198 mmol L^{-1} , respectivamente (FIGURA 18).

FIGURA 18 – CURVA ANALÍTICA DE CISTEÍNA-L- CLORIDRATO QUANTIFICADA PELO ENSAIO DE ELLMAN. ABSORBÂNCIA MEDIDA NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 412 nm



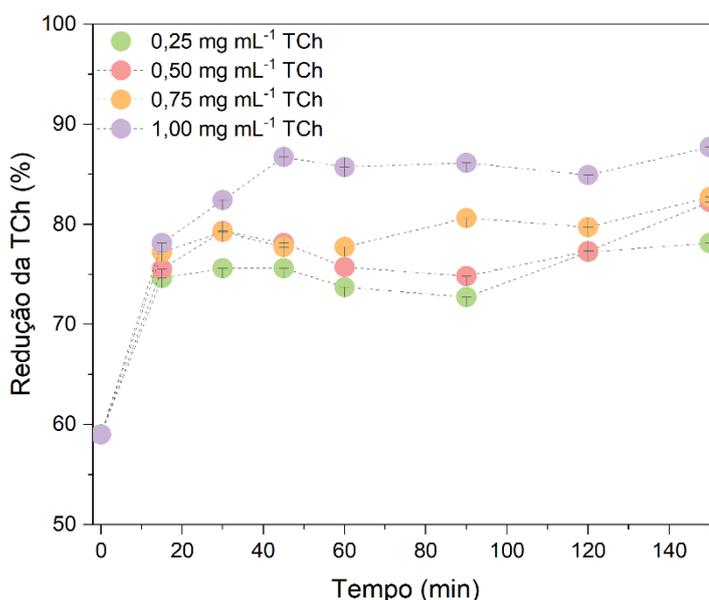
FONTE: A autora (2023).

Através do ensaio de Ellman, a quitosana tiolada (TCh) exibiu uma quantidade total de 2,16 mmol de SH/g de quitosana, sendo que destes, 41% representavam grupos -SH livres e 59% foram encontrados na forma de ligações dissulfeto (-S-S-), resultante da oxidação de dois grupos sulfidril (-SH). A quantidade de ligações dissulfeto foi calculada subtraindo a quantidade de grupos tiol livres da totalidade de tiol após a redução do polímero com NaBH_4 .

Conforme quantificado, no polímero modificado há a presença de ligações dissulfeto. O borohidreto de sódio é um agente redutor usado para reduzir os íons prata em Ag^0 e clivar essa ligação dissulfeto (BROWN, 1960), podendo reduzir etapas no processo de síntese das nanopartículas. Portanto, como um passo preliminar para a incorporação da TCh nas AgNPs, a cinética de redução das pontes dissulfeto presentes na TCh foi desenvolvida para garantir a redução completa para manter os grupos -SH disponíveis para a interação sequencial com a prata.

Após 15 minutos de reação foi possível notar uma estabilização da porcentagem de TCh reduzida para as concentrações de 0,25, 0,50 e 0,75 mg mL^{-1} (FIGURA 19). Para reduzir a TCh a 1,00 mg mL^{-1} , foram necessários 45 min para observar a estabilização. Portanto, conhecendo o tempo necessário para reduzir as ligações dissulfeto na TCh com o borohidreto é possível também estimar o tempo de reação com a prata.

FIGURA 19 – CINÉTICA DE REDUÇÃO DAS LIGAÇÕES DISSULFETO PRESENTES NA QUITOSANA TIOLADA

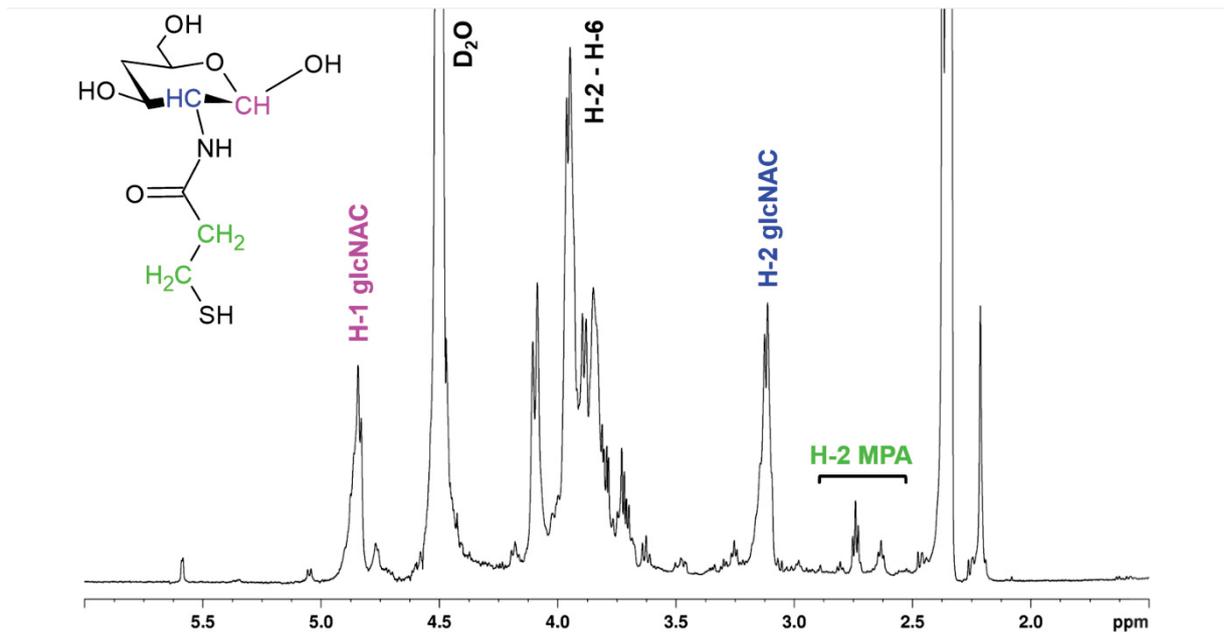


FONTE: A autora (2023).

A estrutura da TCh foi estudada pelos métodos espectroscópicos de RMN ^1H e infravermelho com reflectância total atenuada (FTIR-ATR), conforme Figura 20 e Figura 21. O espectro de RMN ^1H da TCh mostrou δ entre 3,72 e 4,10 ppm, valores muito próximos aos obtidos para os hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 da quitosana purificada (FIGURA 20). Este dado indica que a modificação realizada não

alterou as ligações glicosídicas nem envolveu a despolimerização da quitosana, o que afetaria a cadeia principal característica do polímero.

FIGURA 20 – ESPECTRO DE RMN DE HIDROGÊNIO (RMN ^1H) RESOLVIDO PARA QUITOSANA TIOLADA EM D_2O , A 70°C , 400 MHz. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM (δ)



LEGENDA: H-1, H-2, H-6 (hidrogênio ligado ao carbono 1, 2 e 6), D_2O (água deuterada), glcNAC (porção β -D-N-acetilglucosamina), MPA (ácido-3-mercaptopropiônico).

FONTE: A autora (2023).

Para formar um tiômero, ou seja, um derivado tiolado, o grupo amino primário das subunidades de glucosamina da quitosana é modificado com grupos tiol devido à formação de uma ligação amida entre o grupo amino da quitosana e o ácido carboxílico do MPA (BERNKOP-SCHNÜRCH, 2005). A presença de δ de dois tripletos em 2,63 e 2,74 ppm referentes aos hidrogênios do grupo $-\text{CH}_2$ presentes no ácido 3-MPA confirmam a inserção do grupamento $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ na subunidade de glucosamina da quitosana (TABELA 7) (HAN et al., 2010).

TABELA 7 - ATRIBUIÇÕES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS ANÁLISES DE RMN DE HIDROGÊNIO (RMN ^1H) DA TCh. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)

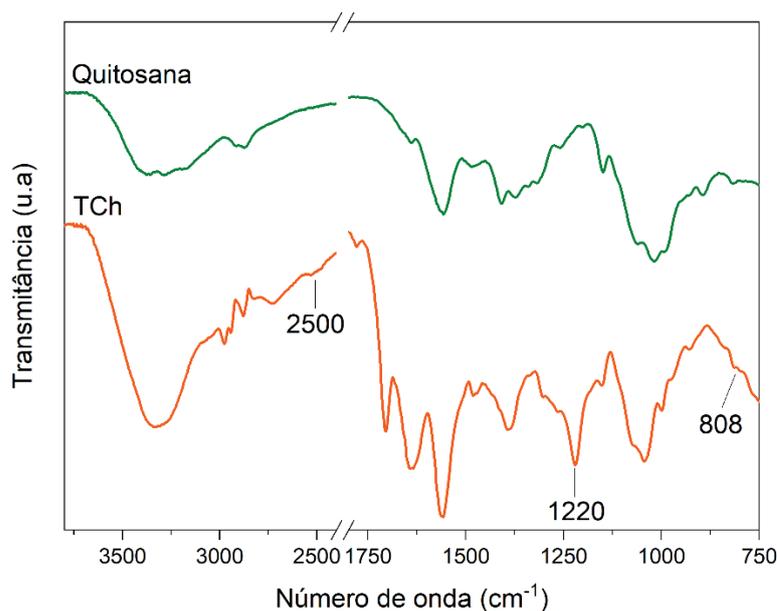
Posição	TCh
glcNH ₂	^1H (δ)
H-1	4,84
H-2	3,13
H-3	
H-4	
H-5	3,72-4,10
H-6	
glcNAC	^1H (δ)
H-1	4,83
Tiolação	
-CH ₂ mais próximo do SH	2,63
-CH ₂ intermediário	2,74

LEGENDA: H-1, (...), H-6 (hidrogênio ligado ao carbono 1 a 6), glcNH₂ (porção β -D-glucosamina), glcNAC (porção β -D-N-acetilglucosamina).

FONTE: A autora (2023).

Os espectros de FTIR da quitosana não modificada apresenta bandas na região de 3600-2960 cm^{-1} , referentes à deformação axial de O-H com ligação de hidrogênio sobrepondo-se à deformação axial de N-H da amina primária. A banda torna-se menos resolvida para a TCh, indicando a modificação da vibração da N-H da amina (FIGURA 21).

FIGURA 21 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA A QUITOSANA PURIFICADA E A QUITOSANA TIOLADA (TCh)



FONTE: A autora (2023).

No espectro de infravermelho da TCh (FIGURA 21), a presença de bandas em 808 cm^{-1} , referente à ligação dissulfeto S-S e 1220 cm^{-1} relacionada ao estiramento -C-SH (ESQUIVEL et al., 2015) indicam a existência de mercaptanos, uma vez que tais bandas não são vistas nos espectros da quitosana sem modificação. Além disso, a banda em 2500 cm^{-1} referente ao estiramento -SH pode estar relacionada à presença de grupos sulfidril ligados à molécula de quitosana. A banda em 1388 cm^{-1} pode ser descrita como deformação $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ (TARANEJOO et al., 2016). Demais atribuições estão descritas na Tabela 8.

TABELA 8 – ATRIBUIÇÃO DE BANDAS DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA A QUITOSANA PURIFICADA E PARA A QUITOSANA TIOLADA

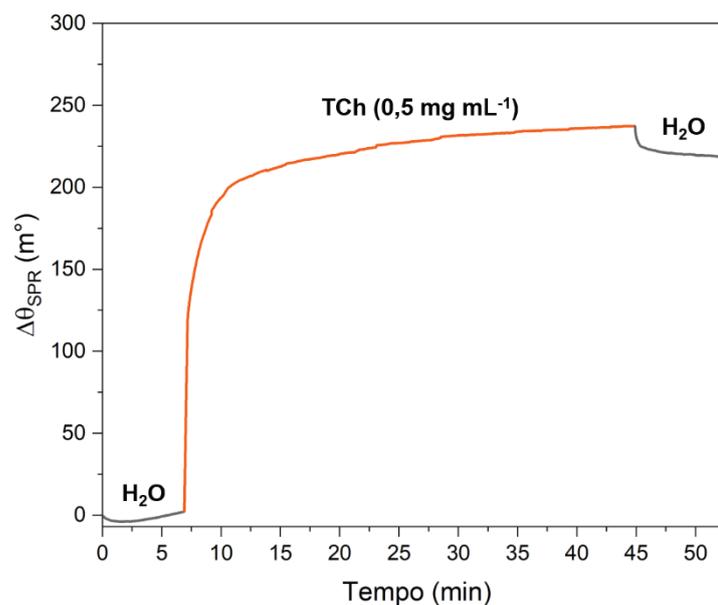
Número de onda (cm^{-1})		Atribuição
Quitosana	TCh	
3382+3290+3169 (F/l)	3600-3000 (F/l)	Deformação axial de N-H de amina primária + Deformação axial de O-H com ligação de hidrogênio
	2980 (f)	Vibrações da ligação C-H
2870 (f)	2880 (f)	Sobreposição de bandas de deformação axial de C-H + Deformação axial de O-H
	2500 (f)	Vibrações da ligação -S-H
1640 (f)	1640 (F)	Deformação axial assimétrica e simétrica de C=O de amida primária
1560 (F)	1560 (F)	Deformação axial assimétrica e simétrica de N-H
1480 (f)	1480 (f)	Deformação axial de C-N de amina primária
1407+1375+1340 (f)	1388 (f)	Vibrações da ligação -C-N-H
	1220 (F)	Vibrações da ligação -C-S-H
1067 (f)	1067 (f)	Vibrações da ligação C-O-C que unifica as unidades do esqueleto de glucosamina
	808 (f)	Vibrações da ligação -S-S- de pontes dissulfeto

* F = forte; f = fraca, m = média e l = larga
 FONTE: A autora (2023).

A presença de grupos sulfidril em proteínas ou em polímeros os torna capazes de se adsorver na superfície do ouro, devido à interação SH-Au (FREEMAN et al., 1995; O'BRIEN et al., 2000). Sabendo disso, foi realizado um teste no equipamento SPR para verificar a presença de grupamentos SH na quitosana e se estes eram capazes de se ligar ao ouro presente no aparato do equipamento.

O sensorgrama da Figura 22 mostra a resposta em tempo real da ligação do polímero sobre o substrato de SPR, onde os eventos de estabilização da linha de base, da ligação covalente da TCh e dissociação de moléculas fracamente ligadas estão presentes. Após a estabilização do sistema com água (linha cinza na Figura 22), é possível notar um aumento da variação do θ_{SPR} após a adição da solução de TCh (linha laranja na Figura 22). A variação efetiva do ângulo do SPR foi de 219 m° . Este processo de adsorção ocorreu de forma forte o suficiente para que na etapa de lavagem com água pouca variação do θ_{SPR} fosse observada, o que sugere uma ligação forte na superfície do ouro, indicando fortemente a presença de grupamentos SH no polímero interagindo com o ouro do substrato.

FIGURA 22 – SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO) OBTIDO PARA O PROCESSO DE LIGAÇÃO DA TCh ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, EM ÁGUA) SOBRE O DISCO DE SPR LIMPO. AS LINHAS CINZA REPRESENTAM AS ETAPAS DE LAVAGEM E A LINHA LARANJA REPRESENTA A ETAPA DE LIGAÇÃO DO POLÍMERO



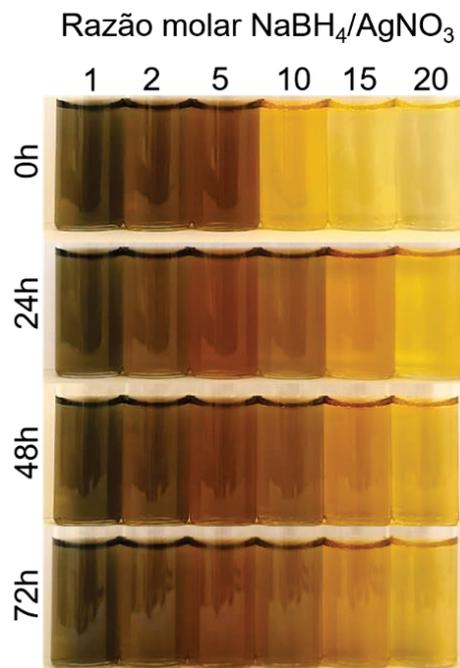
FONTE: A autora (2023).

4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A formação das AgNPs foi realizada através da redução química do Ag^+ (SONG et al., 2009). Diferentes razões molares de $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ foram testadas para formar as AgNPs sem qualquer agente estabilizante. O aspecto macroscópico das dispersões coloidais e o diâmetro das partículas formadas são apresentados na Figura 23 e na Tabela 9, respectivamente.

Nas análises macroscópicas das dispersões coloidais de AgNPs, é possível observar a diferença entre as cores das dispersões em consequência da variação da razão molar. A cor marrom obtida nas preparações com razão molar de 1, 2 e 5 permaneceu a mesma durante o tempo analisado, enquanto a tonalidade amarela das AgNPs com razão de 10, 15 e 20 mudou para marrom claro/amarelo escuro nas primeiras 24 h e a cor permaneceu a mesma até 72 h de observação.

FIGURA 23 – ASPECTO MACROSCÓPICO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE DE REDUÇÃO QUÍMICA COM RAZÃO MOLAR DE $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ DE 1, 2, 5, 10, 15 E 20, OBSERVADAS ATÉ 72h APÓS A SÍNTESE



FONTE: A autora (2023).

Considerando os diâmetros medidos (TABELA 9), as razões molares de 1, 2, 5 e 10 formaram partículas de até 40 nm, enquanto para as razões molares de 15 e 20, o tamanho obtido foi em torno de 70 nm. As amostras foram observadas por 72h, e as partículas formadas com razões molares abaixo de 15 mantiveram o tamanho, consistente com as observações macroscópicas. Estes valores estão diretamente associados com a mudança de coloração observada na Figura 23, uma vez que um aumento no diâmetro de nanopartículas está relacionado com uma alteração de velocidade de movimentação das partículas, que altera a absorção da luz, alterando o comprimento de onda máximo do espectro de varredura (λ_{max}) destas amostras. Portanto, a coloração das dispersões estão diretamente relacionados à este

comprimento de onda (DESAI et al., 2012). Este resultado corrobora com Song et al. (2009), em que nanopartículas de prata com razão molar de 10 resultaram em nanopartículas dispersas na faixa de 30-40 nm, sem formar aglomerados de partículas.

TABELA 9 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE DE REDUÇÃO QUÍMICA COM RAZÃO MOLAR DE $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ DE 1, 2, 5, 10, 15 E 20, OBSERVADAS ATÉ 72h

Razão molar $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$	Diâmetro hidrodinâmico (nm)			
	0h	24h	48h	72h
1	32 ± 0	46 ± 1	60 ± 2	48 ± 6
2	23 ± 1	24 ± 0	27 ± 1	32 ± 1
5	12 ± 0	15 ± 0	16 ± 1	17 ± 0
10	37 ± 5	37 ± 1	39 ± 2	33 ± 14
15	70 ± 4	54 ± 15	99 ± 34	109 ± 41
20	72 ± 10	210 ± 17	210 ± 73	272 ± 76

FONTE: A autora (2023).

As amostras também foram avaliadas em relação ao seu potencial zeta (potencial ζ) e UV-vis. Para todos os valores de razão molar, foi observado o valor de λ_{max} entre 380 e 400 nm, como pode ser observado na Tabela 10.

TABELA 10 - COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DO ESPECTRO DE VARREDURA (λ_{max}) (nm) DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE DE REDUÇÃO QUÍMICA COM RAZÃO MOLAR DE $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ DE 1, 2, 5, 10, 15 E 20, OBSERVADAS ATÉ 72h

Razão molar $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$	Comprimento de onda máximo do espectro de varredura (λ_{max}) (nm)			
	0h	24h	48h	72h
1	398	398	398	400
2	395	397	397	399
5	388	389	391	392
10	388	391	393	392
15	392	395	397	397
20	392	391	392	392

FONTE: A autora (2023).

Todas as dispersões de AgNPs formadas apresentaram λ_{\max} entre 390 e 400 nm, o que evidencia a formação das partículas (TABELA 10). A ressonância dos elétrons livres nas nanopartículas metálicas através da incidência da luz forma um pico de ressonância em 390-410 nm e a variação desse pico se deve à distribuição de tamanho das partículas. O aumento da área do pico integrado da banda de absorção está relacionado ao aumento do tamanho das partículas e à diminuição do espaço entre elas, levando à aglomeração (DESAI et al., 2012). Ao longo do tempo, todas as amostras tiveram uma alteração em seu λ_{\max} , o que corrobora com os valores medidos de tamanho.

As medidas de potencial ζ apresentaram valores entre -32 e -45 mV para todas as amostras produzidas, independentemente do valor de razão molar (TABELA 11). Dessa forma, essas partículas encontram-se dentro regime de estabilidade $\geq |\pm 30|$ (BHATTACHARJEE, 2016).

Devido à estabilidade coloidal, tanto em relação ao diâmetro, potencial ζ e medições de absorbância, além da observação macroscópica de alteração de cor, a razão molar de $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ de 10 foi escolhida para a continuidade dos experimentos.

TABELA 11 – POTENCIAL ZETA (POTENCIAL ζ) DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE DE REDUÇÃO QUÍMICA COM RAZÃO MOLAR DE $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ DE 1, 2, 5, 10, 15 E 20, OBSERVADAS ATÉ 72H. AS AMOSTRAS FORAM DILUÍDAS EM SOLUÇÃO DE KCl (1 mmol L⁻¹)

Razão molar $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$	Potencial zeta (potencial ζ) (mV)			
	0h	24h	48h	72h
1	-37 ± 1	-36 ± 1	-36 ± 0	-32 ± 1
2	-39 ± 1	-39 ± 1	-40 ± 0	-40 ± 2
5	-32 ± 1	-40 ± 2	-40 ± 2	-44 ± 2
10	-35 ± 2	-35 ± 2	-35 ± 2	-39 ± 2
15	-36 ± 2	-35 ± 2	-35 ± 6	-40 ± 2
20	-45 ± 8	-40 ± 2	-46 ± 4	-41 ± 4

FONTE: A autora (2023).

4.4 ESTABILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM QUITOSANA TIOLADA

4.4.1 Escolha da metodologia para a síntese das TCh-AgNPs

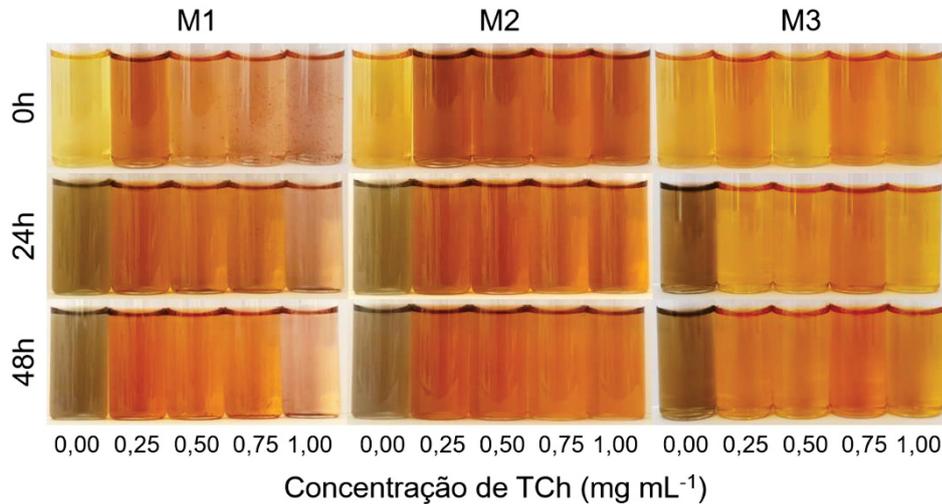
Nas imagens de observação macroscópica (FIGURA 24), é possível notar o padrão de cores para AgNPs e de todas as concentrações de TCh incorporadas para as metodologias M1, M2 e M3. As AgNPs sem agente estabilizador mudaram de cor nas primeiras 24h de experimento, de amarelo para marrom, e apresentaram diâmetro médio de 36 ± 3 nm e λ_{\max} médio de 391 ± 2 nm.

É importante destacar que as dispersões de TCh-AgNPs foram preparadas a partir de concentrações iniciais de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,00 mg mL⁻¹ de TCh, desta forma, considerando a diluição de preparo, as concentrações finais do polímero, de AgNO₃ e NaBH₄ são encontradas na Tabela 2.

Observando os resultados obtidos, para as TCh-AgNPs sintetizadas pela metodologia M1, ou seja, pela formação de um complexo Ag-TCh seguido da redução, a dispersão com a menor concentração da TCh (0,25 mg mL⁻¹) manteve a cor até 48h após a síntese. No entanto, para as demais concentrações, as dispersões começaram a precipitar 24h depois do início da observação. A maior concentração de TCh (1,0 mg mL⁻¹) não foi capaz de estabilizar as nanopartículas e formar uma dispersão coloidal homogênea, já que, imediatamente após a síntese, foi possível observar agregados visíveis e a formação de precipitados (FIGURA 24 – M1).

Quando a luz incide sobre as nanopartículas metálicas, o movimento oscilatório dos elétrons e o aumento da constante dielétrica do solvente induz um desvio do comprimento de onda para um comprimento de onda maior. Os elétrons de condução próximos a cada partícula são compartilhados com as partículas próximas a elas (MAVANI; SHAH, 2013). Com a proximidade e aglomeração das partículas, um acoplamento das absorbâncias dos plásmons leva a uma mudança de cor da dispersão (DAS et al., 2010). Este efeito aumenta à medida que a distância entre as partículas diminui, ou seja, quanto mais próximo estão as partículas (maior agregação), maior será o efeito de acoplamento plasmônico e o deslocamento do λ_{\max} ocorre para maiores comprimentos de onda, causando mudanças na coloração (OLIVEIRA et al., 2015).

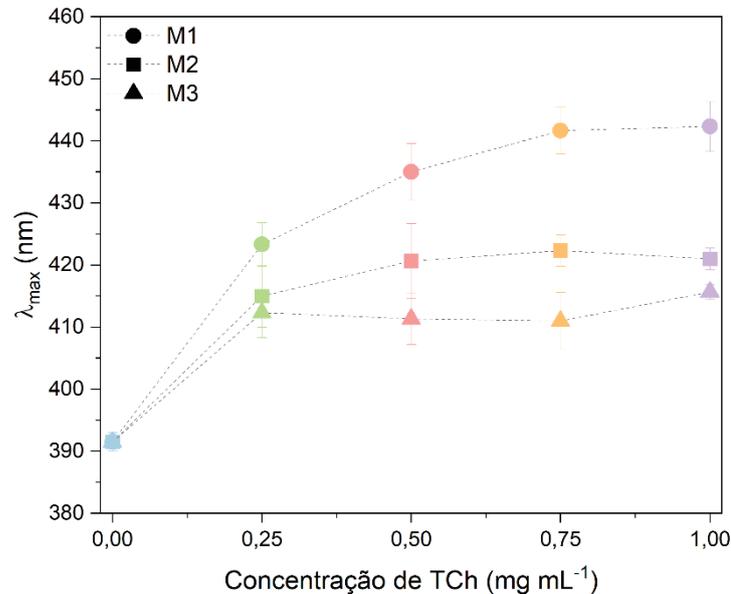
FIGURA 24 - ASPECTO MACROSCÓPICO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TCh (0,00 a 1,00 mg mL⁻¹) PRODUZIDAS PELAS METODOLOGIAS M1, M2 E M3, OBSERVADAS ATÉ 48h



FONTE: A autora (2023).

A incorporação da TCh como agente estabilizante das AgNPs levou a um desvio do λ_{\max} para o a região do vermelho, de maior comprimento de onda (efeito batocrômico) e um aumento do tamanho para todas as concentrações em comparação com AgNPs sem estabilizante (FIGURA 25). O deslocamento para um comprimento de onda entre 410 e 430 nm corrobora com os observados por Lyalina et al. (2022), para AgNPs estabilizadas com quitosana sem modificações. Os tamanhos medidos para essas amostras são apresentados na Figura 26. Todas as amostras apresentaram múltiplas populações. O aumento do tamanho das TCh-AgNPs ocorreu de maneira dependente da concentração, o que significa que quanto maior a concentração da TCh utilizada, maior foi o diâmetro hidrodinâmico da partícula formada. Ao longo do tempo, as partículas com 0,75 e 1,00 mg mL⁻¹ de TCh tiveram os tamanhos aumentados, provavelmente devido à agregação e à sedimentação, que já haviam sido observadas nas imagens macroscópicas (FIGURA 26).

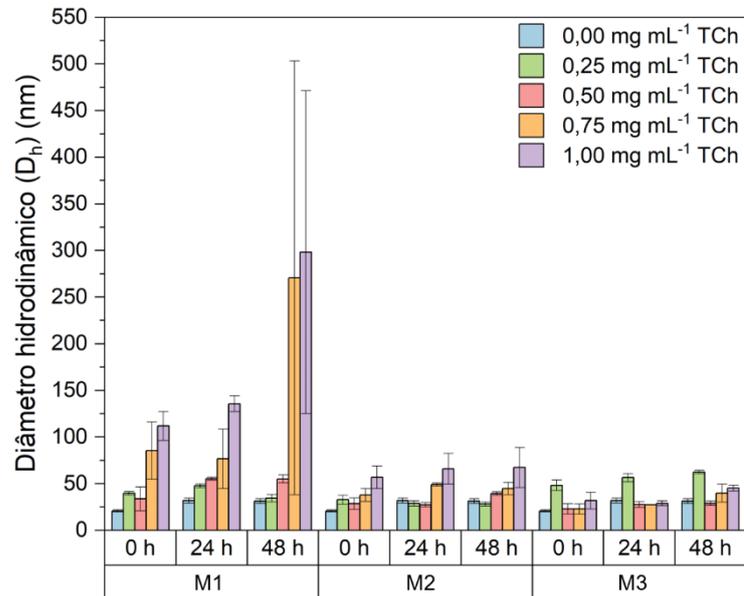
FIGURA 25 - COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DO ESPECTRO DE VARREDURA (λ_{\max}) NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TCh (0,00 a 1,00 mg mL⁻¹) PRODUZIDAS PELAS METODOLOGIAS M1, M2 E M3



FONTE: A autora (2023).

Observando o comportamento da metodologia M2, onde o nitrato de prata é colocado logo após a prévia redução das pontes dissulfeto da TCh, nenhuma das dispersões apresentou precipitados e não mudaram de cor até 48 h, sugerindo estabilidade coloidal. A tonalidade alaranjada das dispersões de TCh-AgNPs foi diferente da tonalidade esverdeada da dispersão das AgNPs (FIGURA 24 – M2). Essa mudança de cor também foi avaliada por UV-vis, onde evidenciou-se o deslocamento batocrômico do λ_{\max} . No entanto, esse aumento de λ_{\max} na M2 foi mais consistente dentre as concentrações de TCh (em torno de 418 nm) quando comparado à M1 (FIGURA 25). Após sintetizadas, as TCh-AgNPs apresentaram um aumento do diâmetro hidrodinâmico dependente da concentração, similar ao observado nas amostras sintetizadas pela M1 (FIGURA 26).

FIGURA 26 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TCh (0,00 a 1,00 mg mL⁻¹) PRODUZIDAS PELAS METODOLOGIAS M1, M2 E M3

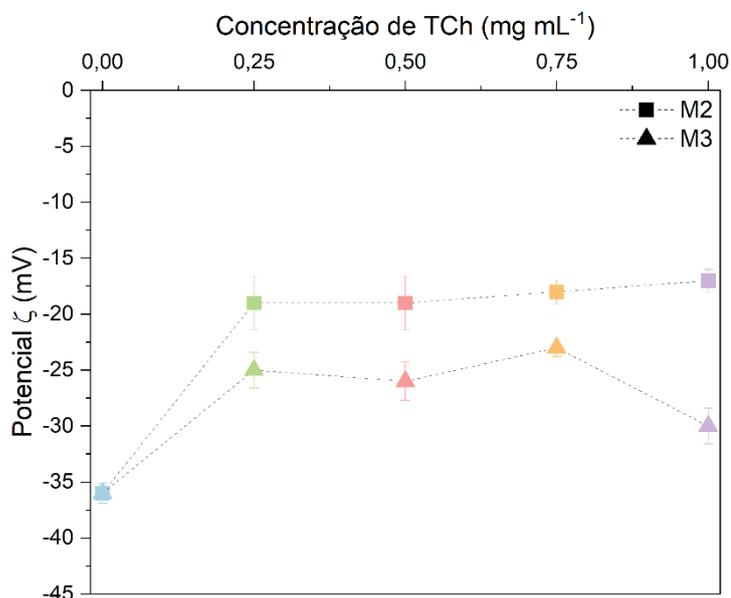


FONTE: A autora (2023).

As observações macroscópicas para a última metodologia, M3, mostraram que as dispersões permaneceram com a mesma cor até 48 h, embora a cor fosse um pouco mais amarelada do que alaranjada, em comparação com a M2 (FIGURA 24 – M3). O deslocamento batocrômico foi observado, mas ocorreu para comprimentos de onda ligeiramente menores quando comparados à M2 (FIGURA 25). Em relação aos diâmetros hidrodinâmicos obtidos, o aumento da concentração do polímero não causou uma mudança impactante, sugerindo que o TCh pode estar interagindo fracamente as AgNPs pré-existentes.

Comparando as três metodologias, notou-se que a M1 apresentou instabilidade e formação de precipitado, e por isso foi descartada. Para observar a diferença entre a M2 e M3, foi realizada a medida do potencial zeta (potencial ζ) (FIGURA 27).

FIGURA 27 – POTENCIAL ζ DAS DISPERSÕES COLOIDAIS DAS TCh-AgNPs OBTIDAS PELAS METODOLOGIAS M2 E M3



FONTE: A autora (2022).

O potencial ζ das nanopartículas de prata foi menor que -30 mV. As TCh-AgNPs formadas pela M2 apresentaram um decréscimo no potencial ζ , indicando uma interação com TCh, um polímero com carga catiônica. A interação entre a carga negativa das AgNPs com a carga positiva do TCh promove um aumento do potencial ζ das nanopartículas. Mesmo assim, a carga resultante foi suficiente para manter a estabilidade coloidal do sistema. Em relação às TCh-AgNPs formadas pela M3, o potencial ζ teve uma variação menor comparados às formadas pela M2.

Relacionando os resultados entre o potencial ζ , λ_{\max} e tamanho, é possível afirmar que a M3 foi menos eficaz para formar uma interação forte o suficiente entre TCh e prata, de modo que o tamanho obtido ficou muito próximo aos das AgNPs, a mudança do potencial ζ foi menos contrastante comparado a M2, e o λ_{\max} , apesar do aumento, foi cerca de 410 nm, muito próximo aos valores descritos para AgNPs.

Com todas as informações coletadas sobre a influência da metodologia na formação das TCh-AgNPs, para a continuidade dos experimentos foi escolhido a metodologia M2, com a inclusão do AgNO_3 depois da completa redução da TCh com NaBH_4 .

A técnica de *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) foi realizada para medir o tamanho e a concentração de TCh-AgNPs. Todas as concentrações de TCh foram

testadas e os tamanhos obtidos foram semelhantes aos diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS. A comparação entre as duas técnicas encontra-se na Tabela 12.

TABELA 12 – MEDIDAS DE TAMANHO DAS TCh-AgNPs OBTIDAS POR DLS E NTA

AMOSTRA	NTA	DLS
0,00 mg mL ⁻¹ TCh	29 ± 2 nm	21 ± 1 nm
0,25 mg mL ⁻¹ TCh	41 ± 0 nm	28 ± 2 nm
0,50 mg mL ⁻¹ TCh	66 ± 1 nm	40 ± 2 nm
0,75 mg mL ⁻¹ TCh	62 ± 5 nm	45 ± 7 nm
1,00 mg mL ⁻¹ TCh	76 ± 8 nm	67 ± 21 nm

FONTE: A autora (2023).

A partir da gravação dos vídeos dos movimentos brownianos das partículas foi possível calcular a distribuição de tamanho das partículas e sua concentração, como pode ser observado na Figura 28 e na Tabela 13.

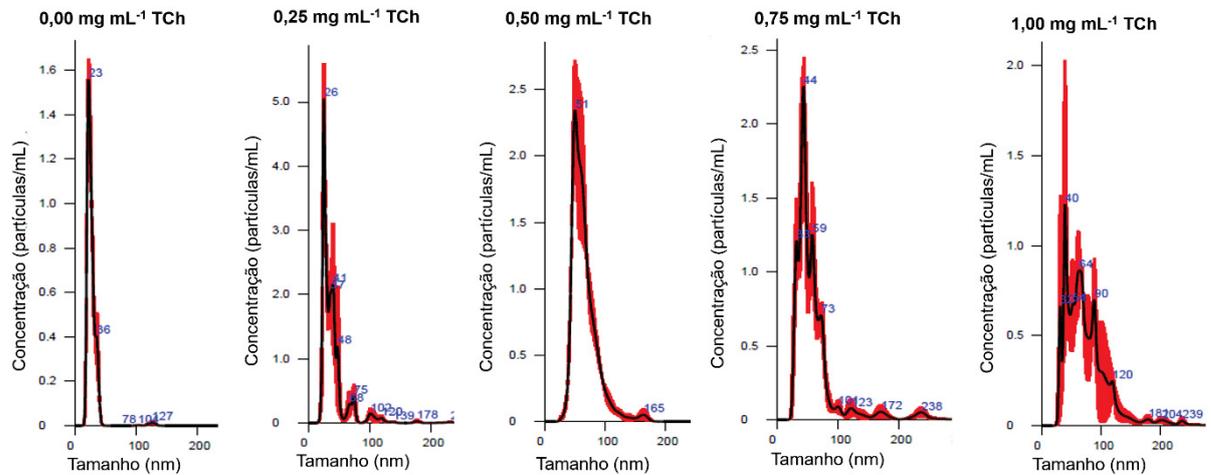
Para a menor concentração de TCh (0,25 mg mL⁻¹) foi observado a presença de uma população de partículas de 26 nm, também presente nas AgNPs sem agente capeador, indicando a ausência de recobrimento das partículas, ou um recobrimento parcial. Já para as concentrações de 0,50, 0,75 e 1,00, a população majoritária foi de partículas com diâmetros maiores, sugerindo que maiores concentrações de polímero estabilizem melhor as partículas. Entretanto, como observado por DLS, as partículas apresentaram um aumento de tamanho dependente da concentração de TCh.

TABELA 13 – CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS POR mL OBTIDA PELA TÉCNICA DE NTA

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (partículas/mL)
0,00 mg mL ⁻¹ TCh	1,82x10 ⁹ ± 4,09x10 ⁷
0,25 mg mL ⁻¹ TCh	7,35x10 ⁸ ± 7,95x10 ⁶
0,50 mg mL ⁻¹ TCh	7,84x10 ⁸ ± 3,49x10 ⁷
0,75 mg mL ⁻¹ TCh	6,62x10 ⁸ ± 1,86x10 ⁷
1,00 mg mL ⁻¹ TCh	5,65x10 ⁸ ± 8,00x10 ⁷

FONTE: A autora (2023).

FIGURA 28 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS TCh-AgNPs COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TCh PELA TÉCNICA DE NTA



FONTE: A autora (2023).

Desta forma, devido à presença de frações recobertas parcialmente, a concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de TCh destacou-se por reduzir o número de populações de diferentes diâmetros, reduzindo a polidispersão da amostra. Unindo as observações realizadas pelo NTA com os dados obtidos por UV-vis, onde foi possível observar uma estabilização do λ_{max} em concentrações acima de $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ de TCh, foi selecionada a concentração de $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ de TCh como a melhor concentração de polímero para a estabilização das nanopartículas.

4.4.2 Avaliação da capacidade de recobrimento da TCh

Para avaliar a quantidade de polímero ligado às AgNPs, foi realizada uma etapa de ultracentrifugação e o sobrenadante foi coletado para quantificar os grupos SH por ensaio de Ellman. Os valores obtidos pela reação de Ellman são mostrados na Tabela 14.

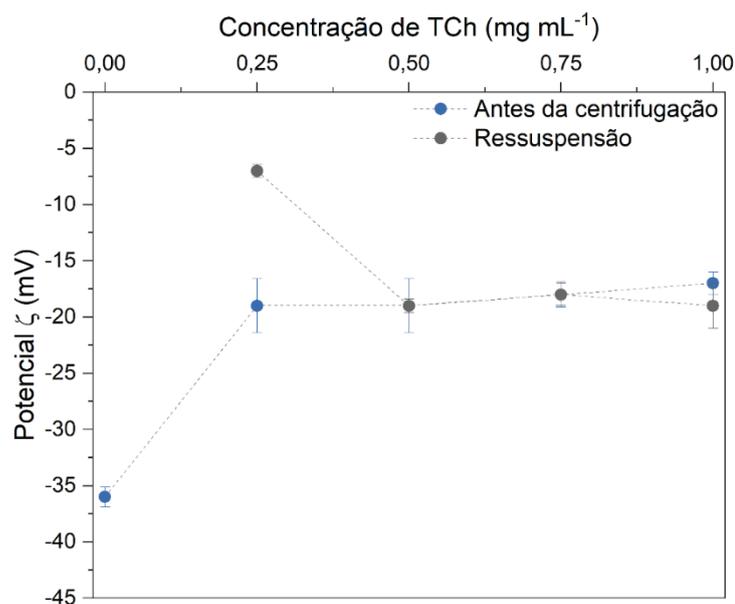
TABELA 14 – QUANTIFICAÇÃO DE GRUPOS SH NO SOBRENADANTE APÓS A ULTRACENTRIFUGAÇÃO DAS TCh-AgNPs

AMOSTRA	ELLMAN – SOBRENADANTE
0,25 mg mL ⁻¹	0,18 mmol L ⁻¹ – 8,5 %
0,50 mg mL ⁻¹	0,20 mmol L ⁻¹ – 9,4 %
0,75 mg mL ⁻¹	0,19 mmol L ⁻¹ – 8,9 %
1,00 mg mL ⁻¹	0,21 mmol L ⁻¹ – 9,6 %

FONTE: A autora (2023).

O precipitado foi ressuspenso em água deionizada e a medida do potencial ζ foi realizada. Não foi possível ressuspender as AgNPs centrifugadas, e assim não foram apresentadas informações sobre potencial ζ destas amostras ressuspensas. A diminuição do potencial ζ foi observada em TCh-AgNPs com 0,25 mg mL⁻¹ de TCh, sugerindo que a cobertura parcial das AgNPs pelo polímero não foi suficiente para estabilização da estrutura, corroborando com os dados observados no NTA. Para as outras concentrações, não foi observada redução do potencial ζ (FIGURA 29) após ultracentrifugação e menos de 10% de TCh foi detectado no sobrenadante, indicando que a cobertura de AgNPs com TCh se mostrou eficiente.

FIGURA 29 - POTENCIAL ζ DAS TCh-AgNPs ANTES DA ULTRACENTRIFUGAÇÃO E DEPOIS DA RESSUSPENSÃO

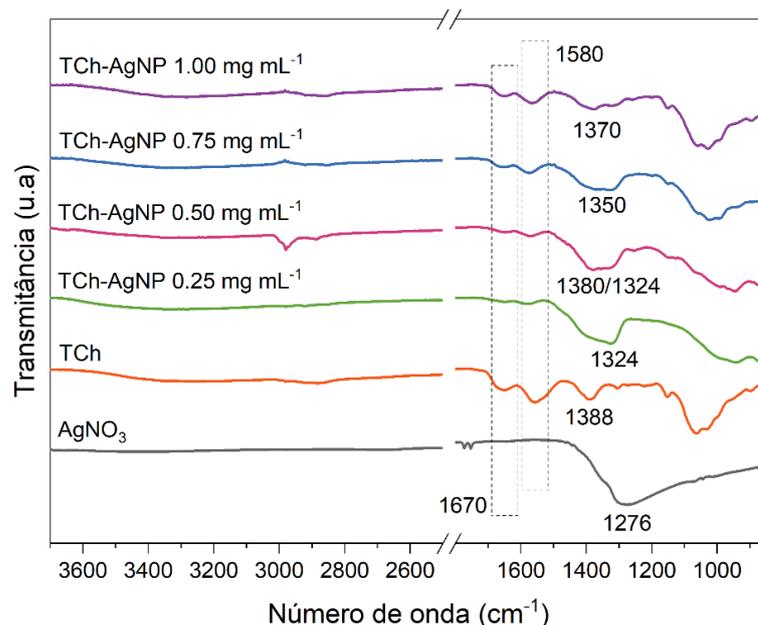


FONTE: A autora (2023).

A provável estrutura formada entre a TCh e as AgNPs é a prata ligada a dois ligantes, em uma estrutura do tipo R-S-Ag-S-R ou R-S-Ag-N-R, com a troca do hidrogênio do NH^+ de uma subunidade não modificada de quitosana por um Ag^+ , e a prata ligada ao enxofre e ao grupo amino (ANDERSSON, 1972). A análise FTIR-ATR de TCh-AgNPs foi realizada e as bandas foram atribuídas para caracterizar a interação entre Ag e TCh (FIGURA 30).

Os espectros de FTIR do AgNO_3 apresentaram absorção em 1276 cm^{-1} , característica do par de íons Ag^+ e NO_3^- . Nos espectros de TCh e TCh-AgNPs, as bandas em 1670 cm^{-1} , a deformação característica de $\text{C}=\text{O}$ da amida está presente em todas as amostras, com diferentes intensidades. O mesmo ocorre com a banda em 1580 cm^{-1} , que surge possivelmente pela vibração NH_3 , e ambas as bandas não estão presentes nos espectros de AgNO_3 . O deslocamento da banda de vibração da ligação $-\text{C}-\text{N}-\text{H}$ de 1388 cm^{-1} para 1324 , $1380/1324$, 1350 e 1370 cm^{-1} , respectivamente, indica que a vibração do NH foi afetada devido à ligação da prata aos grupos amino e enxofre (WEI; QIAN, 2008).

FIGURA 30 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA O AgNO_3 , QUITOSANA TIOLADA (TCh) E TCh-AgNPs EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



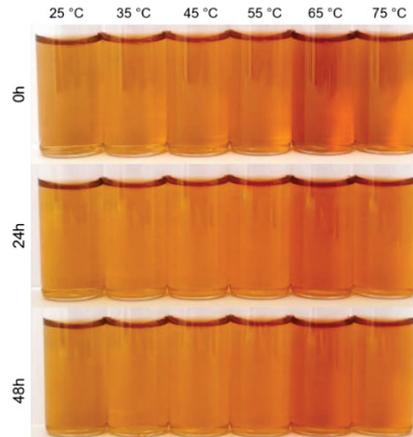
FONTE: A autora (2023).

4.4.3 Influência da temperatura

Para completar a otimização da síntese de TCh-AgNPs, a temperatura também foi avaliada. Para todas as temperaturas, as TCh-AgNPs foram capazes de formar dispersões de cores semelhantes (FIGURA 31).

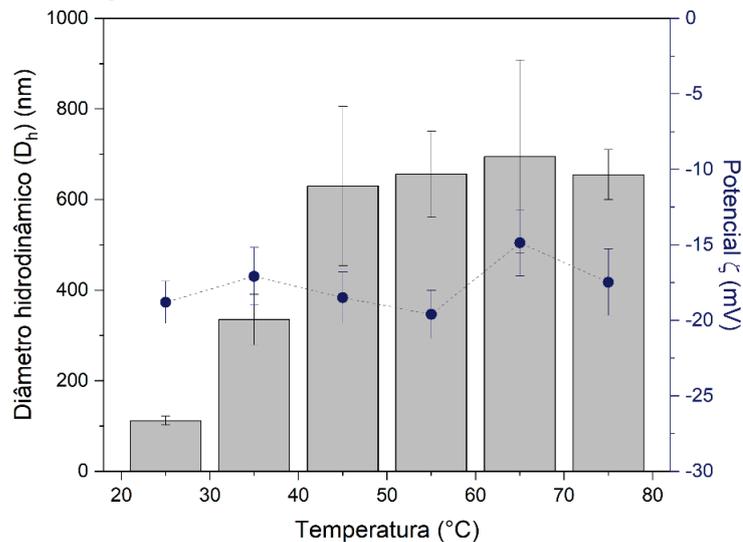
A coloração alaranjada das dispersões se manteve semelhante, tornando-se visivelmente mais escura para as temperaturas de 65 e 75 °C (FIGURA 31). Nenhuma precipitação foi observada, mesmo quando os diâmetros hidrodinâmicos obtidos foram acima de 100 nm (FIGURA 32).

FIGURA 31 - DISPERSÕES COLOIDAIS DE TCh-AgNPs COM 0.5 mg mL⁻¹ DE TCh EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA



FONTE: A autora (2023).

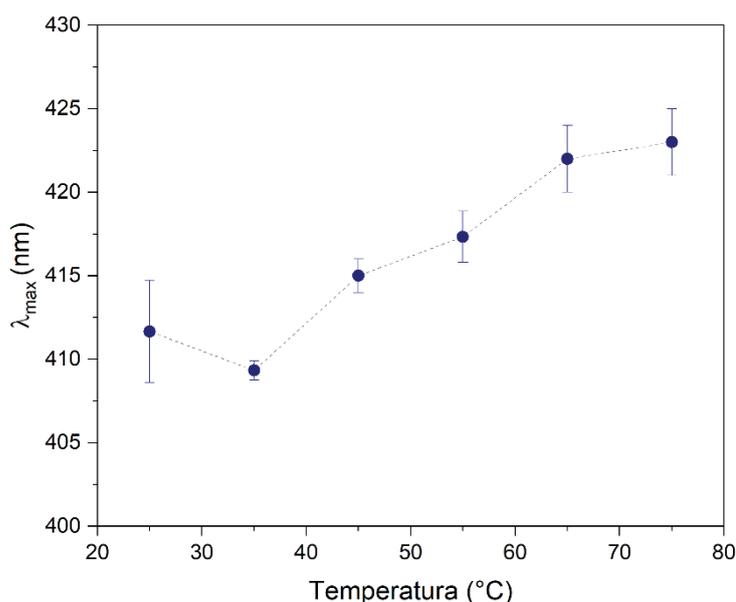
FIGURA 32 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ζ DAS TCh-AgNPs COM 0,5 mg mL⁻¹ DE TCh EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA



FONTE: A autora (2023).

Neste experimento, foi possível observar a correlação entre o tamanho da partícula (FIGURA 32) e λ_{\max} (FIGURA 33). Com o aumento da temperatura, a frequência de colisões entre as partículas aumenta, o que pode culminar na formação de agregados. Conforme observado, os tamanhos das partículas aumentaram à medida que a temperatura aumentou, o que também foi observado pelo UV-vis, com o deslocamento do λ_{\max} para maiores comprimentos de onda do maior a cada aumento de temperatura. Neste caso, temperaturas mais baixas ajudaram a formar pequenas estruturas. O potencial ζ das amostras ficou na faixa de -18 mV para todas as temperaturas testadas.

FIGURA 33 - COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DO ESPECTRO DE VARREDURA (λ_{\max}) DAS TCh-AgNPs COM $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ DE TCh EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

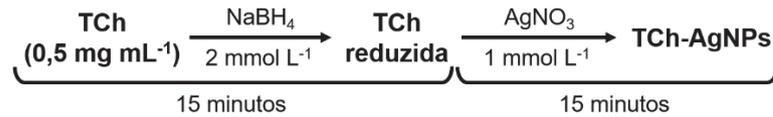


FONTE: A autora (2023).

Com a avaliação da temperatura, a temperatura ambiente de 25°C foi escolhida para finalizar a otimização, em função dos menores valores de diâmetro hidrodinâmicos e λ_{\max} . A partir da otimização realizada referente à metodologia, ao tempo de reação, à temperatura e à concentração de TCh, o esquema de reação ilustrativo mostrado na Figura 34 representa as melhores condições de síntese escolhidas: TCh a $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$, reduzido com 2 mmol L^{-1} (25 mL) de solução aquosa NaBH_4 por 15 min, para reduzir as ligações dissulfeto presentes no polímero. A solução aquosa de AgNO_3 1 mmol L^{-1} (5 mL) foi adicionada para formar as

nanopartículas de prata capeadas com TCh e a solução foi deixada sob agitação por 15 min. A síntese foi realizada a 25 °C. Com a otimização da metodologia, foi realizada a caracterização das TCh-AgNPs.

FIGURA 34 – ESQUEMA DE REAÇÃO OTIMIZADA PARA A SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA CAPEADAS COM QUITOSANA TIOLADA

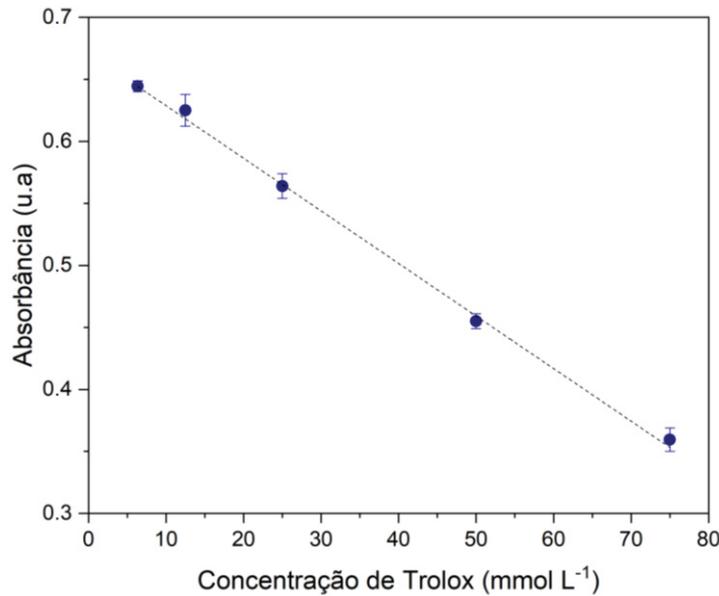


FONTE: A autora (2023).

4.4.4 Avaliação da estabilização do radical ABTS^{•+}

Grupos sulfidril e nanopartículas de prata possuem a capacidade de estabilizarem radicais livres (ZHOU et al., 2013). Desta forma, o ensaio de ABTS foi realizado para verificar a interação Ag-SH e o uso desta ligação na formação das TCh-AgNPs. Para quantificar esta atividade em relação ao trolox, foi realizada uma curva analítica. A curva analítica obteve um R² de 0,9981 e a equação da reta: absorvância = 0,67119 – 0,00424 × [mmol L⁻¹]. Os limites de detecção e quantificação foram calculados e os valores obtidos foram 0,063 e 0,190 mmol L⁻¹, respectivamente (FIGURA 35).

FIGURA 35 - CURVA ANALÍTICA DO TROLOX OBTIDA PELO ENSAIO DE ABTS COM CONCENTRAÇÕES ENTRE 6,35 E 75 mmol L⁻¹. ABSORBÂNCIA MEDIDA NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 734 nm

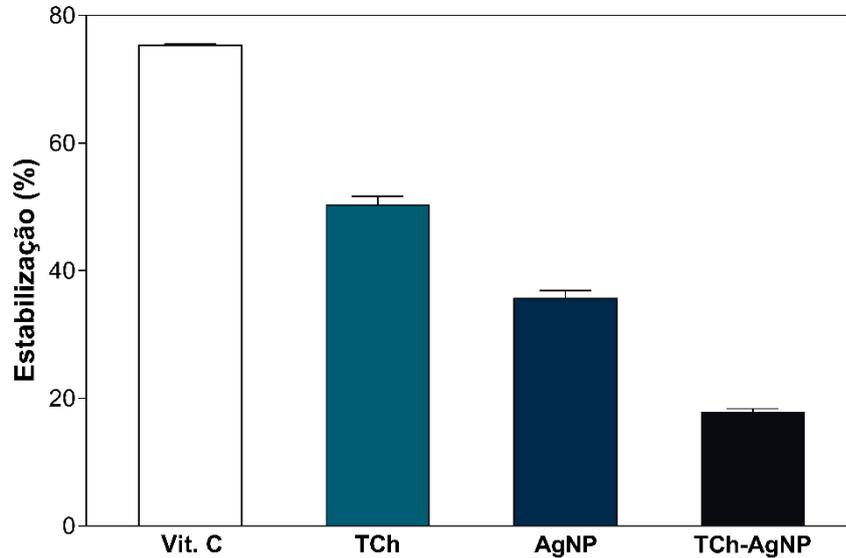


FONTE: A autora (2023).

O ensaio baseia-se na descoloração do reagente ABTS[•]. Esta descoloração depende da capacidade da amostra de doar elétrons, estabilizando este radical. Assim, quanto maior a descoloração da amostra (do azul para o transparente), maior a capacidade da amostra em estabilizar o radical. O resultado mostrado na Figura 36, mostra que os valores obtidos em equivalentes de trolox [(TE)/g] foram de 111 ± 25 (TE)/g, 82 ± 2 (TE)/g e 47 ± 1 (TE)/g para a TCh, as AgNPs e as TCh-AgNPs, respectivamente.

A porcentagem de estabilização foi quantificada e a TCh obteve maior porcentagem ($50,4 \pm 1,3\%$), devido à presença de grupamentos SH livres, que atuaram estabilizando o elétron do ABTS[•]. Também foi determinado o percentual de estabilização de um antioxidante conhecido, a vitamina C ($75,4 \pm 0,1\%$). A ordem decrescente de atividade foi Vitamina C > TCh > AgNPs ($35,7 \pm 1,1\%$) > TCh-AgNPs ($17,9 \pm 0,5\%$). Foi possível notar uma diferença estatística entre as TCh-AgNPs em relação a Vitamina C e em relação a TCh ($p < 0,05$).

FIGURA 36 – PORCENTAGEM DE ESTABILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTENDO RADICAL ABTS*



FONTE: A autora (2023).

Estes valores sugerem que os grupamentos SH presentes na TCh são usados para estabilizar as AgNPs, reduzindo sua atividade antioxidante e corroborando com as vibrações espectroscópicas observadas no FTIR-ATR referente às TCh-AgNPs (FIGURA 21).

Após a caracterização das TCh-AgNPs, foi realizada a ancoragem dos anticorpos anti-rK39 na superfície das partículas.

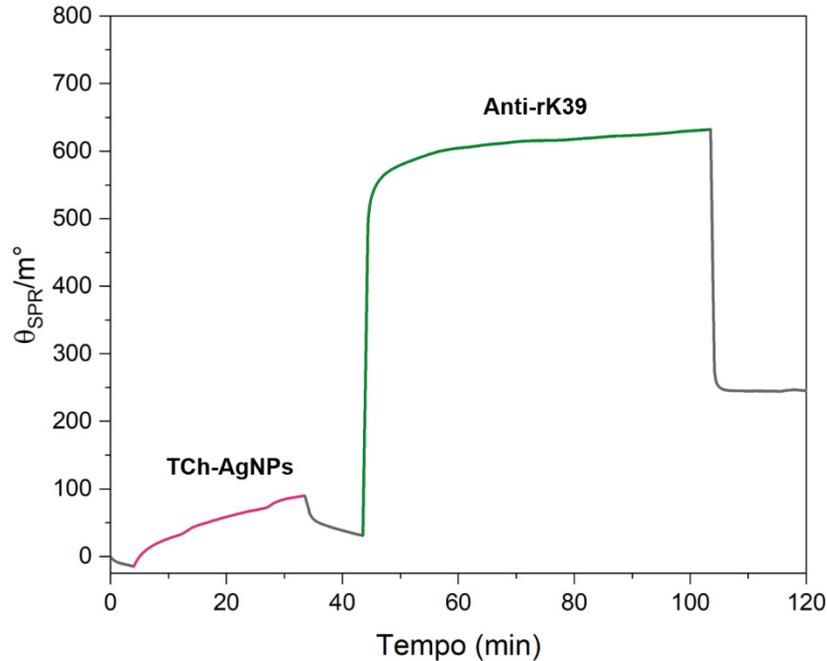
4.5 LIGAÇÃO COVALENTE DOS ANTICORPOS NA SUPERFÍCIE DAS TCh-AgNPs

A ligação covalente dos anticorpos na superfície das TCh-AgNPs foi mediada por uma solução aquosa de EDC/NHS. Esta metodologia já foi bem estabelecida em literatura para outras partículas, como por exemplo nanopartículas de ouro modificadas com grupamentos tiol (PASQUA, DI et al., 2009) e na ancoragem de imunoglobulinas (YOUNG et al., 2005). O procedimento envolve a ativação dos grupamentos carboxílicos da porção Fc dos anticorpos com EDC/NHS e a inserção das TCh-AgNPs. Neste caso, a ligação ocorre através dos grupos COOH dos anticorpos com os grupos NH₂ não modificados da quitosana presentes na TCh-AgNPs, deixando os grupamentos F_{ab} expostos.

De acordo com o sensorgrama obtido (FIGURA 37), após a estabilização do sistema com tampão PBS pH 7,2 (linha cinza na FIGURA 37) ocorreu a etapa de adsorção das nanopartículas (linha rosa na FIGURA 37), cuja variação efetiva do ângulo foi de $58,58 \text{ m}^\circ$, relativamente pequena, mas parte das partículas manteve-se adsorvidas à superfície do disco. A absorção de fótons e a excitação dos plásmons próximos à superfície das partículas fazem com que os campos eletromagnéticos gerados sejam responsáveis pelos sinais observados por nanopartículas em espectroscopias de superfície (MALINSKY et al., 2001).

A imobilização das TCh-AgNPs gerou uma resposta efetiva menor no SPR quando comparado apenas ao polímero (FIGURA 22). Este dado corrobora com duas observações importantes: o fato de o polímero estar em menor concentração nas TCh-AgNPs, uma vez que a concentração inicial da síntese é $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ (concentração testada com o polímero livre), mas a concentração final é de $0,071 \text{ mg mL}^{-1}$ (TABELA 2) e a maior disponibilidade de grupamentos SH para ligação com o ouro, conforme observado e discutido no teste da estabilização do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (FIGURA 36). Mesmo com uma menor quantidade de grupos SH livres, as TCh-AgNPs demonstram uma ligação sobre o ouro e contribuem para a ancoragem do elemento de reconhecimento (o anti-rK39).

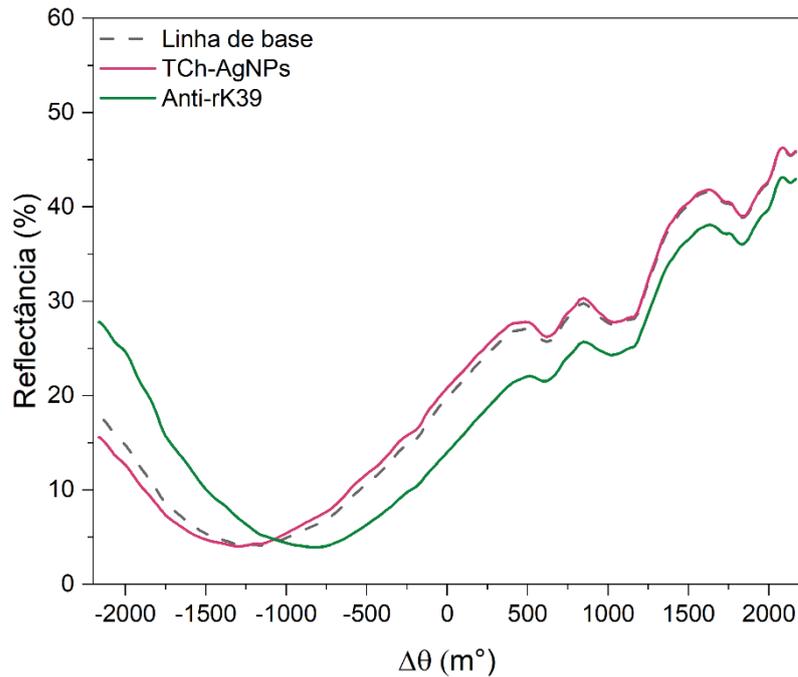
FIGURA 37 - SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO) OBTIDO PARA O PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DO CHIP SENSOR DE SPR COM 11-MUA, ATIVAÇÃO COM EDC/NHS, IMOBILIZAÇÃO DAS TCh-AgNPs, ATIVAÇÃO COM EDC/NHS E IMOBILIZAÇÃO DO ANTI-rK39 ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) NA SUPERFÍCIE DA PARTÍCULA



FONTE: A autora (2023).

Com a imobilização do anticorpo anti-rK39, a variação efetiva do ângulo foi de $215,5 \text{ m}^\circ$ (linha verde na Figura 37). Esta variação do ângulo de SPR também pode ser caracterizada pelas curvas de refletância, evidenciando que mesmo após a imobilização do anticorpo o mínimo de refletância é mantido. Isto sugere que o máximo acoplamento entre as ondas é mantido, ou seja, mantém-se as condições de máxima transferência de energia entre a onda incidente e a onda de plásmons de superfície (FIGURA 38). Desta forma, a adsorção das TCh-AgNPs e o anti-rK39 resultou no aumento relativo no ângulo de SPR, provavelmente devido ao aumento do número de moléculas acopladas à superfície ativada da SAM, demonstrando assim, uma excelente resposta da eficiência desse processo de deposição dos anticorpos na superfície das partículas.

FIGURA 38 – CURVA DE REFLECTÂNCIA DAS ETAPAS DE SÍNTESE DAS TCh-AgNPs SOBRE O SENSOR DE SPR



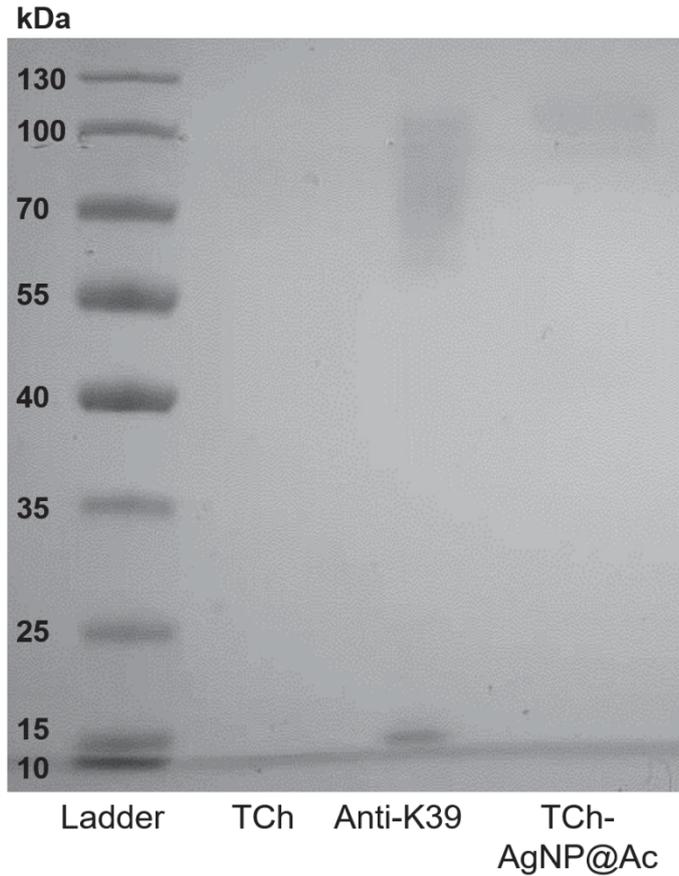
FONTE: A autora (2023).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com laurilsulfato de sódio (SDS) foi realizada com o intuito de caracterizar a ligação entre os anticorpos e as nanopartículas. Dessa forma, foi realizada a eletroforese do anticorpo na forma livre e na forma ligada às TCh-AgNPs. É possível notar que há a migração dos anticorpos, uma vez que a velocidade de migração através do gel depende da sua massa. Os padrões obtidos estão apresentados na (FIGURA 39).

É possível observar que a TCh não apresenta padrão de migração. Já o anti-rK39 apresenta uma banda bem pronunciada entre 55 e 100 kDa. Devido as condições desnaturantes do experimento, a banda referente a cadeia pesada é de 55 kDa, enquanto as cadeias leves possuem 25 kDa. O valor de 100 kDa, também observado na migração das partículas ancoradas com os anticorpos, se refere aos IgGs rK39, o que demonstra que os anticorpos estão ligados à superfície da partícula uma vez que migraram menos na eletroforese. Esta diferença entre os anticorpos livres e ligados às TCh-AgNPs indica que esses anticorpos estão ancorados à superfície das TCh-AgNPs. Este experimento foi realizado com a concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-rK39, afim de verificar se a metodologia de ligação entre a partícula e o anticorpo seria eficaz. Com a confirmação do ancoramento de uma baixa concentração de anticorpo

na superfície das TCh-AgNPs, esta metodologia de ancoragem foi posteriormente realizado com diferentes concentrações de anti-rK39, de 10 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

FIGURA 39 – PADRÕES DE MIGRAÇÃO OBTIDOS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) COM DODECILSULFATO DE SÓDIO (SDS) PARA AMOSTRAS DE TCh ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, EM ÁGUA), TCh-AgNPs@Ac CONTENDO O ANTICORPO NA CONCENTRAÇÃO DE $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ E A SOLUÇÃO DE ANTICORPO ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), COMPARADOS COM O LADDER



FONTE: A autora (2023).

Para complementar a caracterização, foi realizado O cálculo de número de moléculas de anti-rK39 por nanopartícula. Os valores obtidos encontram-se na TABELA 15.

TABELA 15 - NÚMERO DE ANTICORPOS ANTI-Rk39 POR NANOPARTÍCULA DE TCh-AgNP@Ac

Concentração anti-rK39	Moléculas de anti-rK39/mL	Anti-rK39/partícula
10 x10 ⁻⁶ g mL ⁻¹	6,02x10 ¹³	7,79x10 ⁴
20 x10 ⁻⁶ g mL ⁻¹	1,20x10 ¹⁴	1,53x10 ⁵
30 x10 ⁻⁶ g mL ⁻¹	1,80x10 ¹⁴	2,29x10 ⁵
40 x10 ⁻⁶ g mL ⁻¹	2,40x10 ¹⁴	3,06x10 ⁵
50 x10 ⁻⁶ g mL ⁻¹	3,01x10 ¹⁴	3,84x10 ⁵

FONTE: A autora (2023).

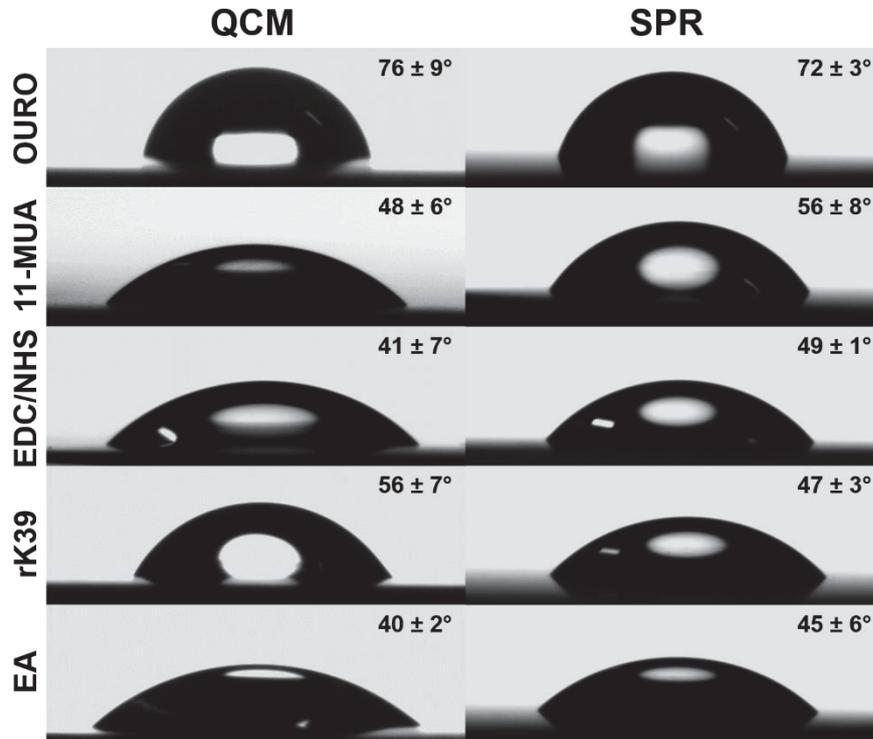
4.6 CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES

A construção dos biossensores foi iniciada pela formação da SAM. A formação de um filme denso na superfície do substrato garante que as moléculas (principalmente os alcanotióis) fiquem ordenadas e fortemente ligadas, contribuindo para que a fixação das nanopartículas ou de biomoléculas, como a proteína rK39, ocorra de forma homogênea. A modificação desta superfície confere novas propriedades ao disco de ouro (MALINSKY et al., 2001).

Em consequência à modificação da superfície, as propriedades físico-químicas e óticas foram alteradas, e a técnica utilizada para verificar esta alteração foi a medida do ângulo de contato (FIGURA 40). O valor obtido para o ângulo de contato da água sobre a superfície dos aparatos de QCM e SPR limpos foi de $76 \pm 9^\circ$ e $72 \pm 3^\circ$, respectivamente. A hidrofobicidade da camada de ouro faz com que o ângulo obtido se aproxime de 90° . Após a modificação com 11-MUA, este valor diminui para $48 \pm 6^\circ$ e $56 \pm 9^\circ$, para QCM e SPR, respectivamente, demonstrando que a superfície se torna mais hidrofílica quando comparado ao ouro (BYUN et al., 2012; TAHERI et al., 2017), devido ao empacotamento dos grupamentos -COOH na superfície (BARHOUM; J. FORSTER, 2022).

A modificação com EDC/NHS aumenta ainda mais a característica hidrofílica da superfície devido à conversão dos seus grupos carboxílicos terminais em NHS-ésteres reativos. A hidrofílicidade mantêm-se após o ancoramento da proteína e da etapa de bloqueio, pela inclusão de grupamentos hidrofílicos na superfície (NIEDZIAŁKOWSKI et al., 2021). Para bloquear os sítios inespecíficos foi utilizada a etanolamina (EA), deixando assim os sítios específicos mais dispostos favorecendo a interação Proteína/Anticorpo.

FIGURA 40 – MEDIDAS DO ÂNGULO DE CONTATO ENTRE A ÁGUA E O AR MEDIDOS SOBRE OS APARATOS DE QCM E SPR FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO 11-MUA, ATIVADOS VIA EDC/NHS, ANCORADOS COM A PROTEÍNA rK39 E BLOQUEADOS COM ETANOLAMINA

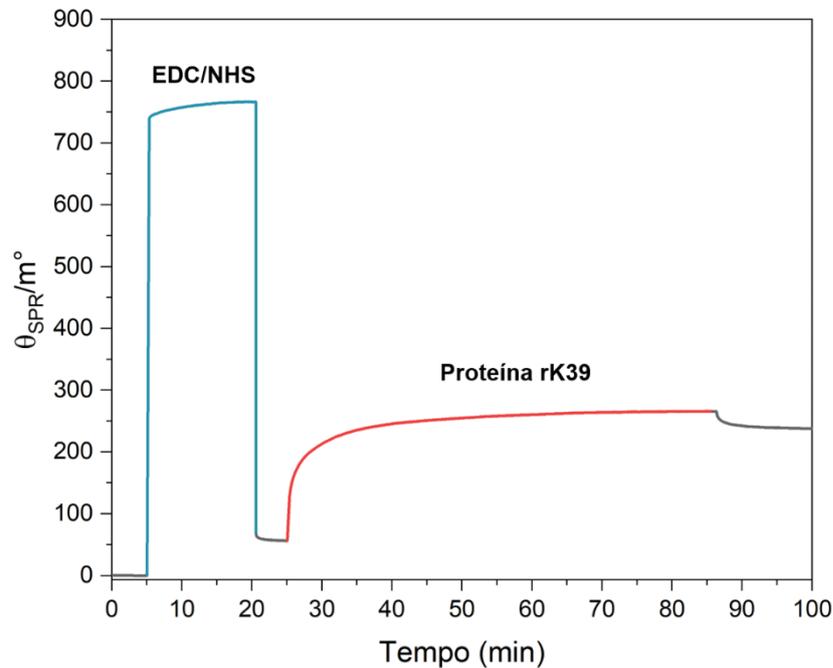


LEGENDA: 11-MUA (ácido 11-mercaptoundecanoico), EDC (Hidrocloro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida), NHS (N-hidroxissuccinimida) e EA (etanolamina).

FONTE: A autora (2023).

Além da caracterização por ângulo de contato, a etapa de imobilização da proteína rK39 também foi monitorada via SPR. O sensorgrama obtido para a etapa de imobilização apresenta eventos típicos para cada estágio (FIGURA 41). A linha de base foi obtida pela adição de uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) sobre a superfície modificada com 11-MUA (1 mmol L^{-1} – em etanol) (em cinza na Figura 41) e a ativação com uma solução de NHS-EDC ($150:100 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente – em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) foi realizada. Uma segunda lavagem com tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) foi realizada para retirada do material fracamente adsorvido, seguido do ancoramento da proteína rK39 (linha vermelha na Figura 41). Após a estabilização, a lavagem com uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) foi realizada para a remoção de proteínas não adsorvidas sobre o disco, reduzindo o θ_{SPR} . Estas etapas podem ser observadas tanto para a modificação com EDC/NHS quanto para a imobilização da proteína rK39.

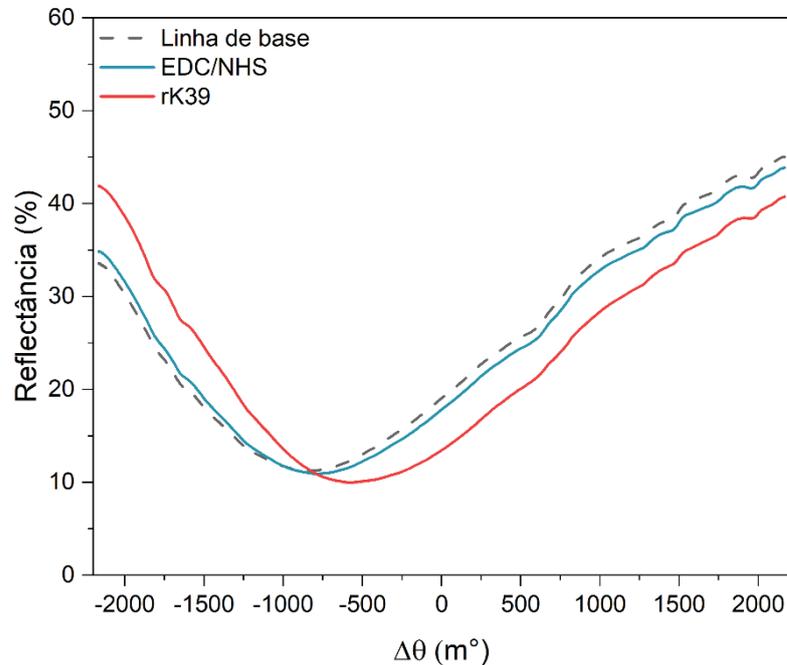
FIGURA 41 - SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO) OBTIDO PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 SOBRE CHIP SENSOR DE SPR, FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO 11-MUA (1 mmol L^{-1}) E ATIVADO VIA NHS-EDC ($150:100 \text{ mmol L}^{-1}$)



FONTE: A autora (2023).

O sensorgrama obtido demonstrou a variação do ângulo maior para a solução de EDC/NHS na etapa de associação que não permaneceu alta após a lavagem (FIGURA 41), ou seja, a variação efetiva do ângulo do SPR foi de $54,9 \text{ m}^\circ$. A solução de EDC/NHS foi adicionado em excesso, portanto uma variação grande do ângulo já era esperada, pois por se tratar de moléculas muito pequenas, esta modificação de grupos terminais altera muito pouco o índice de refração local. A ligação resulta um deslocamento do ângulo de reflectância. Esta mudança efetiva pode ser melhor observada na Figura 42 através das curvas de reflectância. Com a imobilização da proteína, a variação do ângulo ocorreu devido à ligação sobre a superfície funcionalizada e persistiu alta mesmo após a etapa de lavagem, indicando boa cobertura de superfície na concentração utilizada, sendo a variação efetiva do ângulo de $183,5 \text{ m}^\circ$. A variação do ângulo efetiva foi aproximadamente 3,4 vezes maior para a rK39 do que para a solução de EDC/NHS, o que demonstra uma variação do índice de refração local mais pronunciada sobre a superfície do ouro. Esta variação também pode ser observada pelas curvas de reflectância, concordando com o processo de modificação (FIGURA 42).

FIGURA 42 - CURVA DE REFLECTÂNCIA PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 SOBRE CHIP SENSOR DE SPR, FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO 11-MUA (1 mmol L^{-1}) E ATIVADO VIA NHS-EDC ($150:100 \text{ mmol L}^{-1}$)



FONTE: A autora (2023).

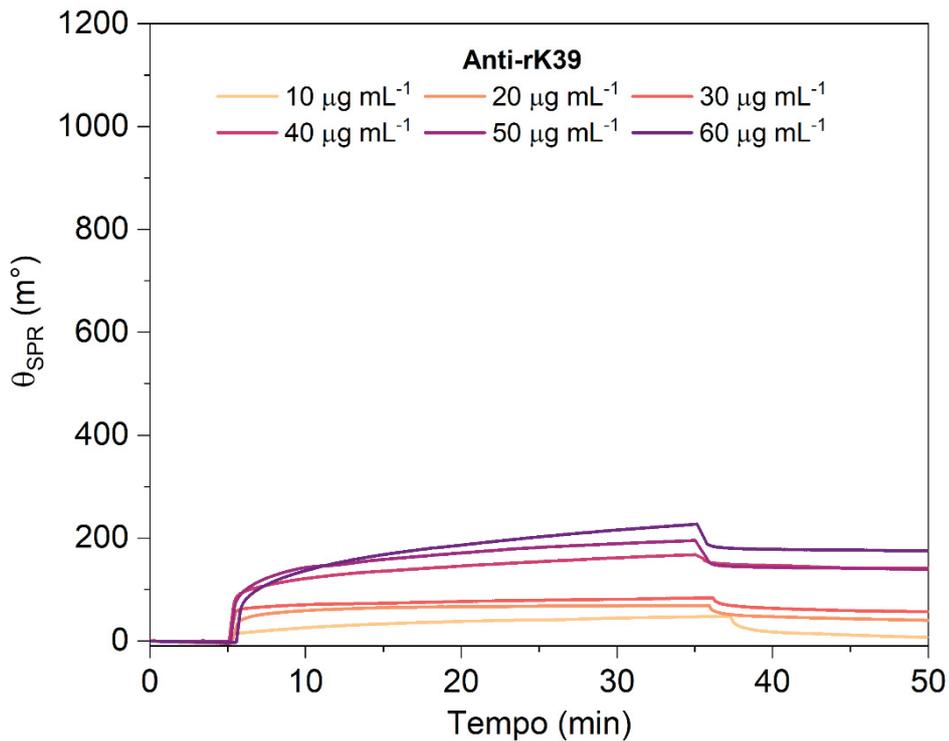
4.7 IMUNODIAGNÓSTICO DA PROTEÍNA rK39

Após a ancoragem da proteína rK39 no disco na etapa de construção dos biossensores, foi testado a interação entre o anti-rK39 e a proteína ancorada no disco. Para isso, as análises foram realizadas tanto para o anti-rK39 na forma livre quanto na forma ligada sobre as nanopartículas (TCh-AgNPs@Ac), em diferentes concentrações. Após a estabilização do sistema com uma solução aquosa de tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2), as amostras foram adicionadas sobre a superfície do disco e a variação do ângulo foi monitorada ao longo do tempo.

Após a etapa de associação, uma etapa de lavagem foi realizada para remover os anticorpos ou partículas contendo anticorpos fracamente adsorvidos (FIGURA 43 e FIGURA 44). O sensorgrama obtido para anti-rK39 na forma livre (FIGURA 43) demonstra o aumento da resposta em função do aumento da concentração de anticorpo e o mesmo ocorre para o anticorpo ligado a partícula (FIGURA 44).

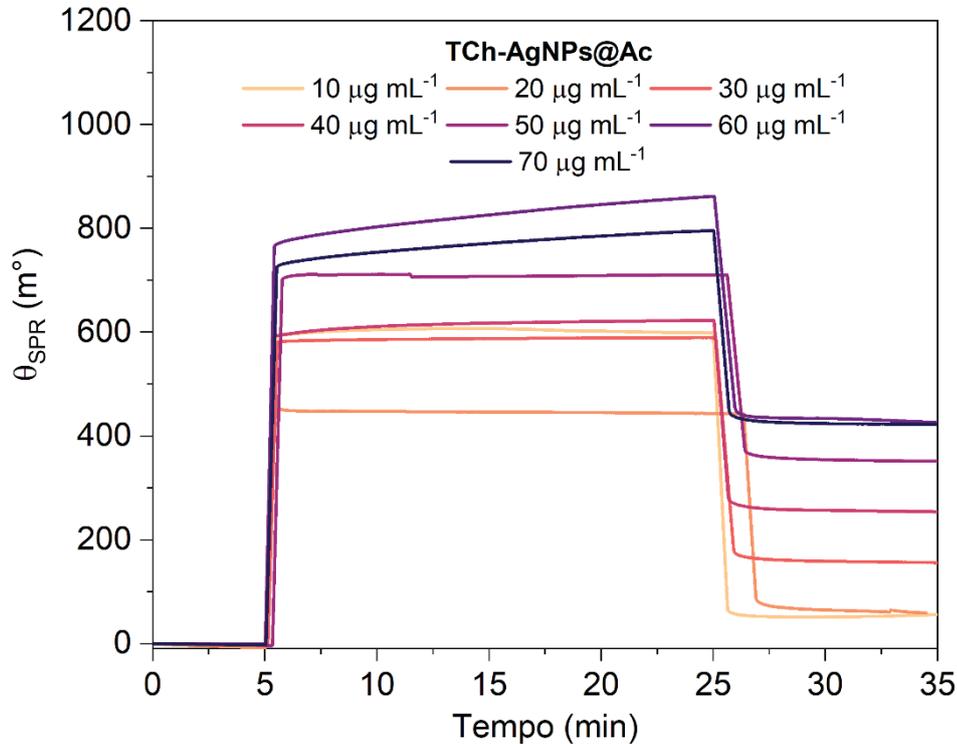
Nota-se que, para o anticorpo livre, apesar da variação efetiva ser alta, não há um estágio de completo equilíbrio mesmo após 35 min de adsorção, indicando um processo de reordenação das moléculas, o que confere a ausência de um *plateau* no gráfico. Já para as TCh-AgNPs@Ac (FIGURA 44), observa-se que o equilíbrio é atingido logo após a associação, principalmente para as concentrações mais baixas de anticorpo, sendo suficiente para obtenção de uma estabilização mais rápida quando comparado ao anti-rK39 livre. Estes resultados sugerem que a conjugação do anticorpo à TCh-AgNP favorece significativamente a cinética da reação entre rK39 e anti-rK39.

FIGURA 43 - SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO DE REAÇÃO) EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS A INTERAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 ANCORADA NO CHIP SENSOR DE SPR COM ANTICORPO ANTI-rK39 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



FONTE: A autora (2023).

FIGURA 44 - SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO DE REAÇÃO) EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS A INTERAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 ANCORADA NO CHIP SENSOR DE SPR COM AS TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



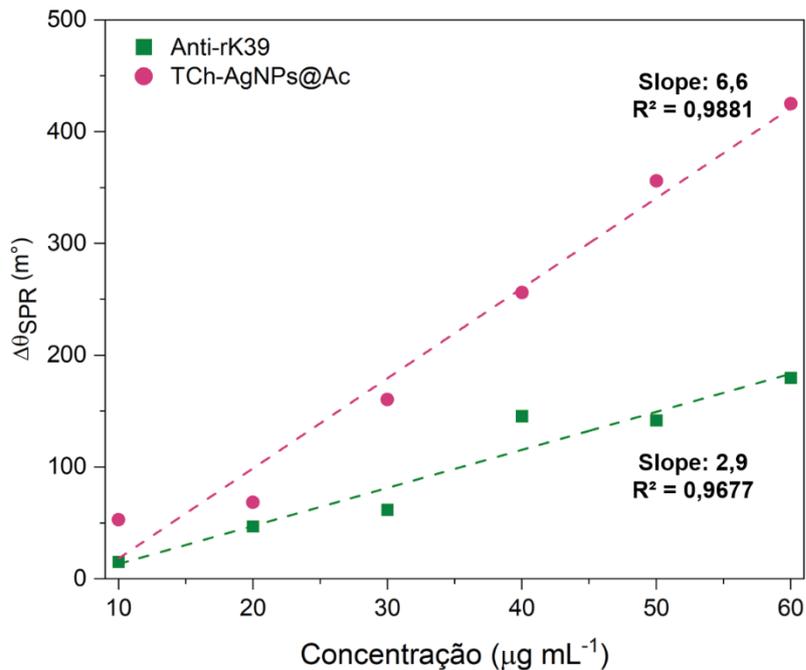
FONTE: A autora (2023).

A partir dos sensorgramas obtidos, a variação efetiva do ângulo do SPR foi calculada, subtraindo o valor da variação final após a dissociação do ponto inicial da linha de base. Colocando a relação entre a concentração e a $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ efetiva das diferentes concentrações, foi possível obter uma correlação linear apresentada na Figura 45. O aumento da concentração do anticorpo livre culmina em um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9677 no intervalo de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando um limite de detecção de 0,228 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e limite de quantificação de 0,692 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já para as TCh-AgNPs@Ac, no mesmo intervalo de concentração (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$), coeficiente de determinação (R^2) de 0,9881 apresentando um limite de detecção de 0,198 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e limite de quantificação de 0,601 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração de 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou menor $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ efetiva, provavelmente devido à saturação dos sítios ativos disponíveis.

A partir da resposta linear obtida, a inclinação da reta para a interação do anticorpo livre com a proteína ancorada no disco foi de 2,9. Já a inclinação da reta obtida a partir da interação do anticorpo ancorado nas TCh-AgNPs@Ac foi de 6,6. A

partir da razão entre os valores da inclinação da reta, foi possível notar que as nanopartículas aumentaram em 2,3 vezes o sinal de detecção do anti-rK39.

FIGURA 45 - RELAÇÃO LINEAR ENTRE A CONCENTRAÇÃO DO ANTI-rK39 E DAS TCh-AgNPs@Ac E A $\Delta\theta_{SPR}$ EFETIVA PARA OS RESULTADOS EVIDENCIADOS NA DETECÇÃO DA PROTEÍNA rK39

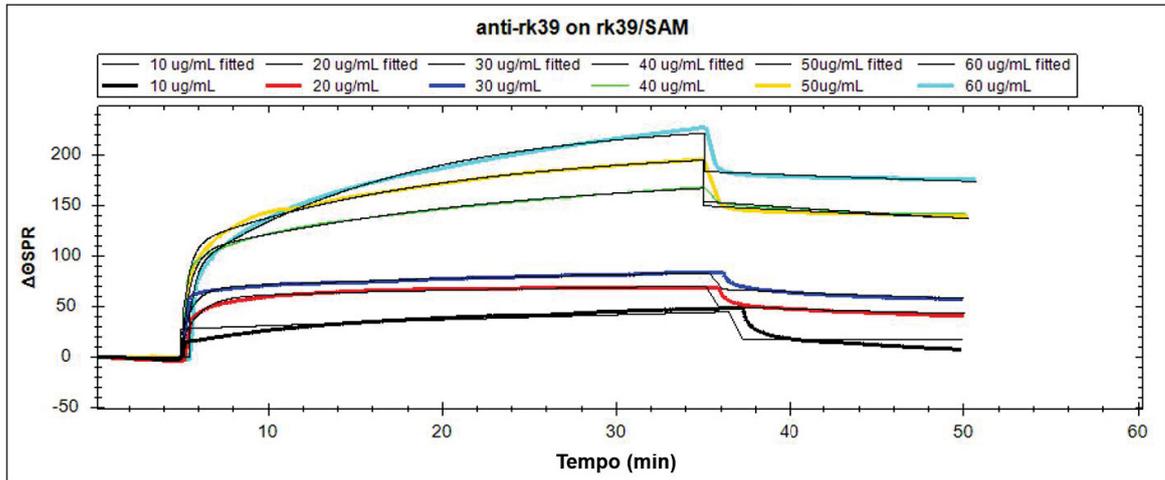


FONTE: A autora (2023).

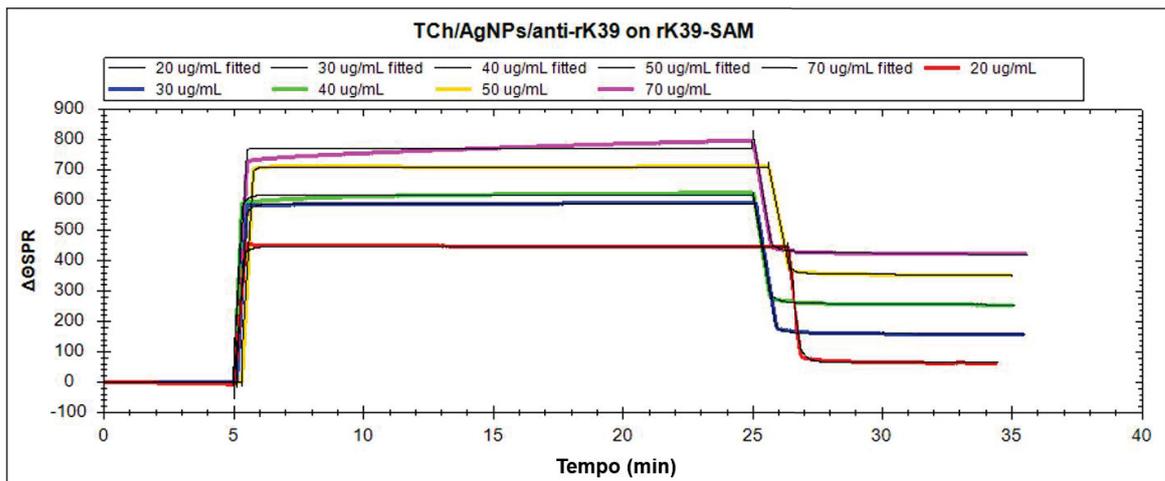
Uma análise quantitativa foi realizada para comparar a cinética de reação das formas livre (anti-rK39) e conjugada (TCh-AgNPs@Ac) do anticorpo com a proteína rK39. Para estas análises, as curvas de SPR obtidas da interação entre anti-rK39 e rK39 (FIGURA 43) e TCh-AgNPs@Ac e rK39 (FIGURA 44) foram ajustadas globalmente usando o software de interação biomolecular Trace Drawer, versão 1.5 (Oy BioNavis Ltd., Tampere, Finlândia) (FIGURA 46). Para estes cálculos, o modelo de interação adotado foi baseado na reação antígeno-anticorpo com estequiometria de 1 para 1 (SOUTO et al., 2015).

FIGURA 46 - CURVAS DE SPR AJUSTADAS GLOBALMENTE A PARTIR DO SOFTWARE DE INTERAÇÃO BIOMOLECULAR TRACE DRAWER, VERSÃO 1.5. (A) AJUSTE OBTIDO A PARTIR DAS CURVAS DE SPR PARA A INTERAÇÃO ENTRE O ANTICORPO LIVRE (ANTI-rK39) E O ANTÍGENO rK39 E (B) AJUSTE OBTIDO A PARTIR DAS CURVAS DE SPR PARA A INTERAÇÃO ENTRE O ANTICORPO CONJUGADO (TCh-AgNPs@Ac) E O ANTÍGENO rK39

A)



B)



FONTE: A autora (2023).

De acordo com o modelo proposto, a equação que representa as reações mencionadas pode ser descrita de forma genérica na Equação 10:



onde:

Ac = anticorpo tanto na sua forma livre (anti-rK39) quanto na sua forma conjugada (TCh-AgNPs@Ac);

ka e kd = constantes cinéticas de associação e dissociação, respectivamente.

A Tabela 16 mostra os parâmetros cinéticos (k_a , referente a cinética de ordem zero e k_d , referente a cinética de primeira ordem) obtidos da interação entre anti-rK39 e rK39, e da interação entre TCh-AgNPs@Ac e rK39.

TABELA 16 – PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS k_a = CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO CINÉTICA E k_d = CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO CINÉTICA OBTIDAS DA INTERAÇÃO DA rK39 COM O ANTICORPO NA FORMA LIVRE (Anti-rK39 - rK39) E COM ANTICORPO NA FORMA CONJUGADA (TCh-AgNPs@Ac – rK39)

INTERAÇÃO	k_a (mol L ⁻¹ s) ⁻¹ *	k_d (s ⁻¹) *
Anti-rK39 – rK39	1,17x10 ⁵	2,28x10 ⁻⁴
TCh-AgNP@Ac – rK39	2,55x10 ⁵	2,51x10 ⁻⁴

* Desvios encontrados para essas medidas não foram significativos ($p < 0.05$).

Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos para ambas as reações se encontram na mesma ordem de grandeza, o que já era esperado tendo em vista que a reação é dependente da natureza da interação entre o antígeno (rK39) e seu anticorpo específico (anti-rK39). Contudo, pode-se observar que o valor da constante cinética de associação para a interação entre TCh-AgNP@Ac e rK39 (k_a : 2,55x10⁵) é cerca de 2,2 vezes maior que o obtido da reação entre anti-rK39 e rK39 (k_a : 1,17x10⁵). Estes resultados sugerem que a cinética é favorecida quando o anticorpo foi conjugado à nanopartícula e contribui com a afinidade obtida pela correlação linear (FIGURA 45).

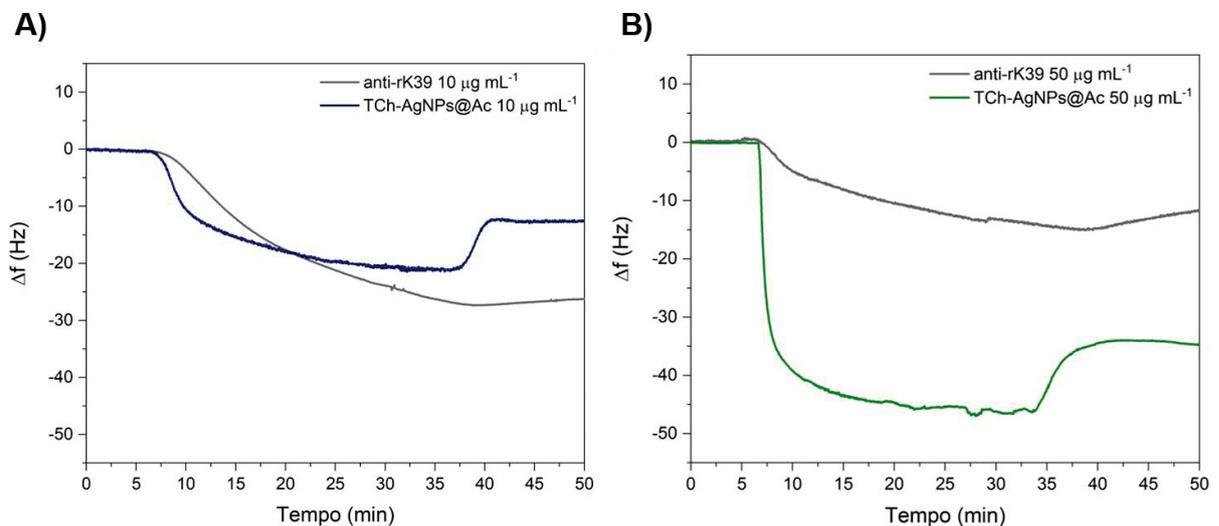
Uma explicação para o aumento da cinética de ligação entre o anti-rk39 ligado às nanopartículas e a proteína rk39 é a teoria de multivalência. A teoria de multivalência de nanopartículas descreve a habilidade das nanopartículas em se conectar simultaneamente com diversos alvos moleculares em níveis celulares e moleculares. Para isso, essas nanopartículas são projetadas com múltiplos ligantes específicos, como anticorpos ou moléculas de reconhecimento em suas superfícies, o que lhes permite realizar ligações altamente seletivas com diferentes tipos de células ou moléculas-alvo. Essa característica multivalente é extremamente vantajosa em aplicações biomédicas, como terapias direcionadas, diagnósticos avançados e liberação controlada de medicamentos (PIETERS, 2009). Além disso, a ligação a um segundo alvo (ou subligante) é potencializada após o primeiro evento de ligação, devido a compensação da entropia. Dessa forma, a ligação antígeno-anticorpo é

facilitada quando ele está ligado à superfície das TCh-AgNPs, reduzindo o tempo de ligação quando comparados aos anticorpos livres.

A fim de contribuir com os dados observados por SPR, o mesmo experimento foi realizado na Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM), onde é possível observar a variação da frequência de vibração do cristal de quartzo (Δf) em função do tempo (FIGURA 47). A redução da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo está relacionada com a massa presente sobre o cristal, de tal forma que o Δf é inversamente proporcional a massa (SULLIVAN; GUILBAULT, 1999; QIAO et al., 2016).

Para ambas as concentrações, de 10 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as TCh-AgNPs@Ac apresentaram variações em um tempo menor comparado ao tempo de adsorção do anticorpo livre, indicando que a cinética de ligação varia quando há nanopartículas.

FIGURA 47 – RESPOSTA OBTIDA POR QCM EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS A INTERAÇÃO DA PROTEÍNA rK39 ANCORADA NO CRISTAL DE QCM COM O ANTICORPO LIVRE E AS TCh-AgNPs@Ac NAS CONCENTRAÇÕES DE (A) 10 E (B) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$



FONTE: A autora (2023).

Na resposta obtida por SPR, o aumento dos valores de $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ correspondem a uma maior variação do ângulo de incidência da luz. Já para o QCM, a diminuição da frequência de vibração do cristal indica um aumento de massa sobre o cristal. Portanto, a partir dos dados obtidos, foi possível observar um o aumento gradativo nos valores de $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ e uma Δf que reduz com o aumento da ligação das moléculas.

Estes dados indicam que o aumento da concentração do anti-rK39 depositado nas TCh-AgNPs afeta a condição ressonante e a cinética de ligação proteína/anticorpo.

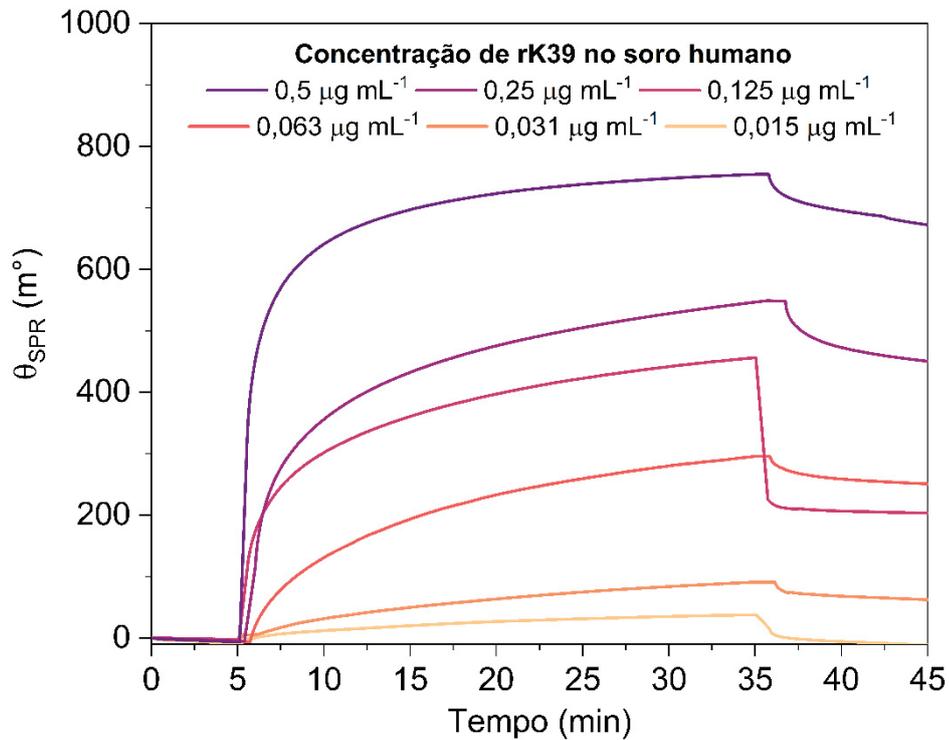
A partir dos dados obtidos tanto por SPR quanto por QCM, foi possível concluir que a interação entre antígeno e anticorpo é facilitada quando o antígeno está ancorado na superfície das nanopartículas de quitosana tiolada (TCh-AgNPs), o que resulta na variação de θ_{SPR} e na Δf , além do aumento da cinética de ligação e do sinal em comparação aos anticorpos não ancorados.

4.8 IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA rK39 EM SORO

Sabendo da capacidade da partícula em detectar a proteína rK39 ancorada no sensor, uma nova hipótese foi estudada: a habilidade das TCh-AgNPs@Ac em reconhecer a proteína em um soro, para mimetizar ainda mais o diagnóstico em pacientes. Neste caso, no disco sensor foi ancorado a nanopartícula recoberta com anti-rK39 na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Seguindo as etapas de limpeza, modificação com 11-MUA (1 mmol L^{-1} – em etanol), ativação com uma solução de NHS-EDC ($150:100 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente – em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2), ancorando as TCh-AgNPs e posteriormente modificando com uma solução de EDC/NHS/anti-rK39 ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) (em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) e bloqueio dos sítios inespecíficos, o disco foi colocado no equipamento. Uma solução de soro contendo a proteína rK39 ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) foi diluída (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200 – em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) e depositadas no disco.

No sensorgrama obtido (FIGURA 48), é possível notar que, mesmo para amostras com altas diluições, ocorreu a interação entre o anti-rK39 presente nas partículas ancoradas com a proteína presente no soro. A variação do ângulo aumenta à medida que a concentração aumenta, o que sugere que a partícula é capaz de detectar baixas concentrações de proteína e, por consequência, possa diagnosticar a doença com baixa carga de antígenos presente.

FIGURA 48 – SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO DE REAÇÃO) EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS A INTERAÇÃO DAS TCh-AgNPs@Ac ANCORADAS NO CHIP SENSOR DE SPR COM O SORO CONTENDO PROTEÍNA rK39 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



FONTE: A autora (2023).

Com estes dados, fica ainda mais evidente que a presença das nanopartículas melhorou a detecção do antígeno pelo anticorpo, amplificando o sinal, aumentando a sensibilidade e reduzindo o tempo de detecção da doença, podendo assim ser diagnosticada e o início do tratamento pode ser realizado, reduzindo as possibilidades de agravamento.

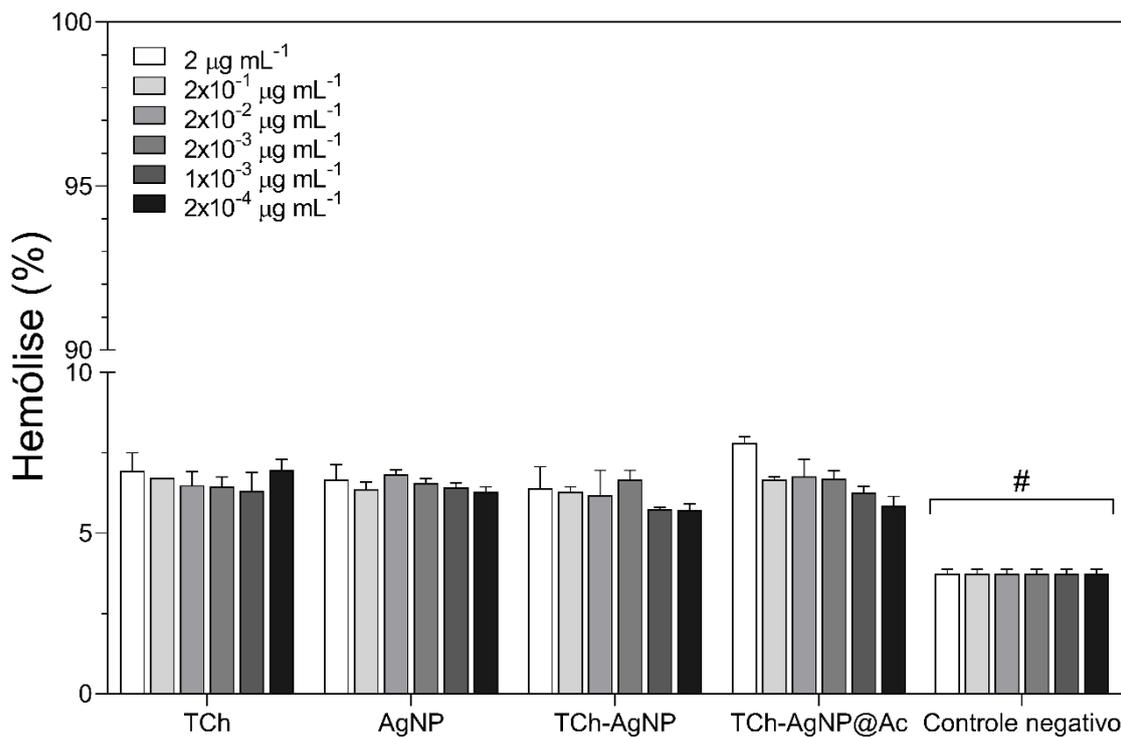
4.9 CULTIVO CELULAR

Após o estudo da capacidade de diagnóstico das partículas, foram realizados ensaios em cultivo celular para observar o comportamento das partículas no tratamento da infecção por *Leishmania*, podendo assim, atuar como uma nanopartícula teranóstica.

4.9.1 Atividade hemolítica

Levando em consideração uma possível aplicação destas partículas via intravenosa, a avaliação da atividade hemolítica em hemácias foi realizada. Além disso, este teste foi utilizado para verificar a atividade das amostras perante uma linhagem celular de baixo metabolismo, para corroborar com o teste de citotoxicidade realizado em macrófagos, uma linhagem de alto metabolismo. Para o cálculo da porcentagem de hemólise (ou seja, lise celular), o valor obtido para as amostras do controle positivo foi considerado 100%. Para todas as amostras, os valores de hemólise foram menores que 10% (FIGURA 49). Todos os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (# indicado na Figura 49). Desta forma, as amostras possuem baixo potencial de hemólise.

FIGURA 49 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE HEMÁCIAS TRATADAS COM TCh, AgNPs, TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$ A $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$)

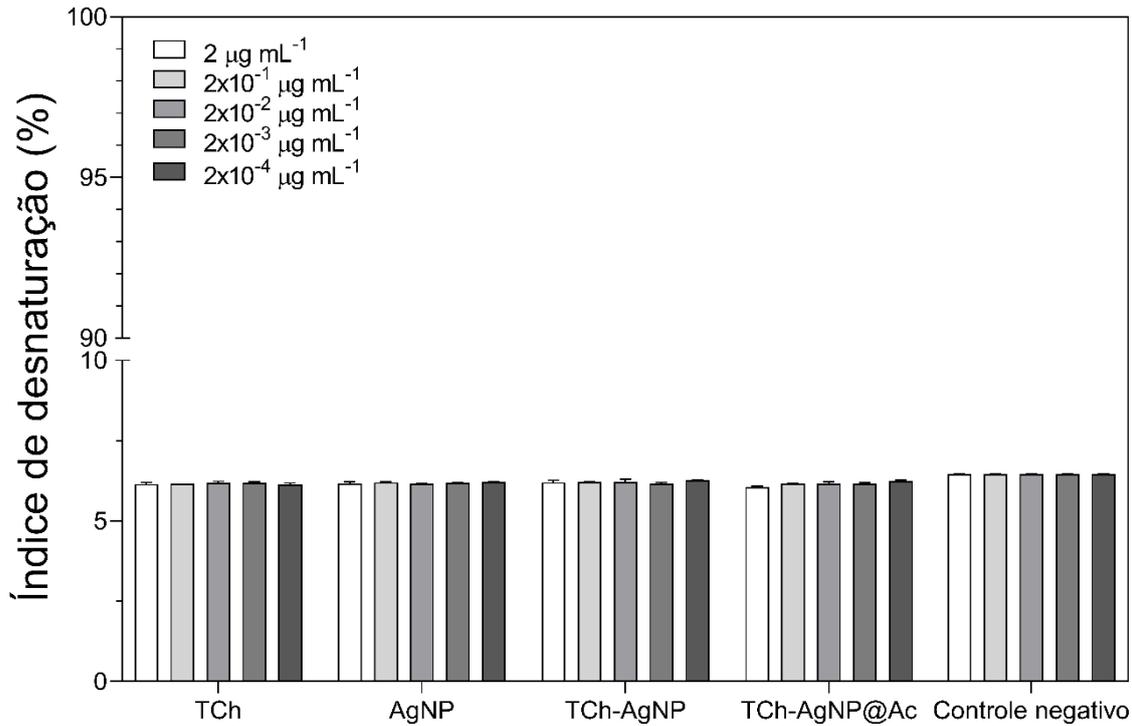


FONTE: A autora (2023).

Além dos danos causados na membrana celular (hemólise), também foi avaliado o dano causado as proteínas celulares, medido pelo índice de desnaturação da oxihemoglobina. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 50. Todos os valores obtidos encontram-se abaixo de 10%, semelhante a atividade hemolítica do

controle negativo, sem apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação as hemácias não tratadas.

FIGURA 50 - AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DESNATURAÇÃO DA OXIHEMOGLOBINA EM HEMÁCIAS TRATADAS COM TCh, AgNPs, TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$ A $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$)



FONTE: A autora (2023).

Os baixos valores de hemólise e baixo dano a oxihemoglobina corroboram para uma possível aplicação intravenosa, uma vez que não causaram danos significativos às células sanguíneas.

4.9.2 Citotoxicidade em macrófagos

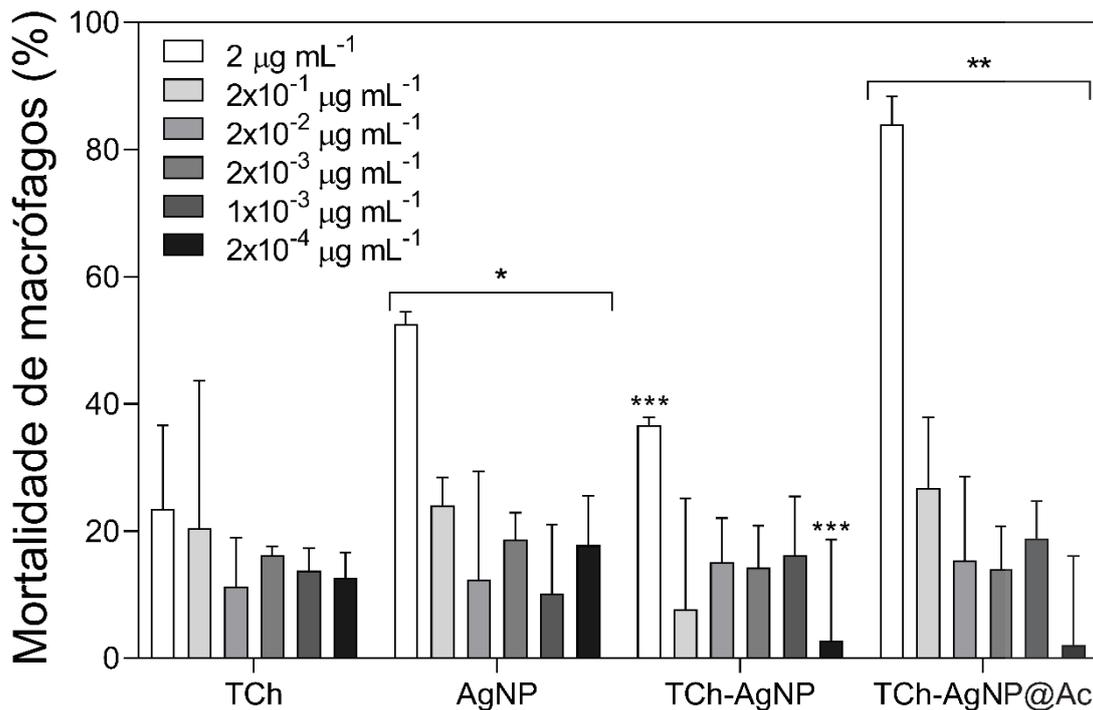
A citotoxicidade celular foi quantificada com base na redução do sal de coloração amarela (MTT) à cristais insolúveis de formazan na coloração roxa, devido principalmente à atividade da enzima succinato desidrogenase.

Considerando a TCh, sua toxicidade celular foi maior para as maiores concentrações, sendo 23% e 20% para as concentrações de 2 e $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (FIGURA 51). Para as demais concentrações, a toxicidade foi inferior a 20%. Este perfil se repetiu para as outras amostras, onde as duas concentrações

mais altas obtiveram altas taxas de citotoxicidade em macrófagos, enquanto para as outras concentrações menores esta taxa foi inferior a 20%. Nas concentrações de 2 e 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os valores de citotoxicidade obtidos foram de 53% e 24% para AgNPs, 37% e 8% para TCh-AgNPs e 84% e 27% para TCh-AgNPs@Ac, respectivamente.

Observando o tratamento com as TCh-AgNPs foi possível observar a diferença estatística entre os tratamentos de 2 e 2×10^{-4} $\mu\text{g mL}^{-1}$ (representado por ***). Já para os tratamentos com AgNPs e TCh-AgNPs@Ac foi observadas diferenças estatísticas entre todas as concentrações (representado por * e **) ($p < 0,05$). O valor de toxicidade obtidos para as TCh-AgNPs@Ac na concentração de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi devido ao pH da solução, que se encontrou em 5,5, muito mais ácido que a capacidade de tamponamento do meio de cultura, em torno de 8.

FIGURA 51 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM TCh, AgNPs, TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ A 0,2 ng mL^{-1}), AVALIADOS PELO REAGENTE MTT



FONTE: A autora (2023).

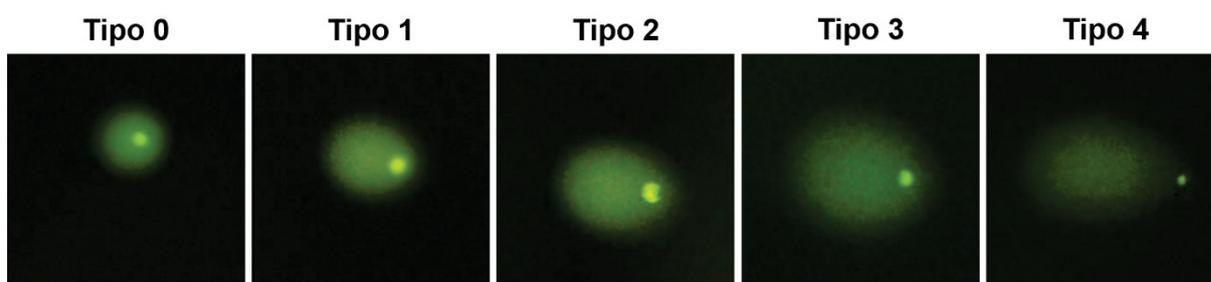
A avaliação da citotoxicidade em macrófagos é especialmente importante para verificar a biocompatibilidade das nanopartículas, e se durante o tratamento farmacológico as partículas seriam mais seletivas para os parasitas, com menor incidência de efeitos citotóxicos nas células de defesa, que são hospedeiras do

parasita *Leishmania*. Portanto, com menos de 20% de morte celular, as TCh-AgNPs e TCh-AgNP@Ac encontram-se adequadas para serem aplicadas em um modelo de infecção experimental de macrófagos contaminados com *Leishmania*.

4.9.3 Ensaio cometa

A técnica do ensaio cometa é utilizada para avaliar os danos ao DNA de células, onde há a lise das membranas celulares seguido da indução da migração eletroforética do DNA em uma matriz de agarose. Este teste foi utilizado para ver o nível de dano causado ao DNA pelos tratamentos com TCh, AgNPs, TCh-AgNPs e TCh-AgNPs@Ac. Nas imagens de fluorescência obtidas, foi realizado a classificação do tamanho das “caudas”, ou seja, fragmentos do DNA submetido à migração eletroforética. A Figura 52 traz micrografias representativas de células encontradas no experimento (independente do tratamento) e foram usadas como base de cada estágio de dano, sendo eles Tipo 0 a Tipo 4, onde o Tipo 0 apresenta DNA íntegro, enquanto o Tipo 4 representa o dano máximo ao DNA, representada pela cauda de cometa (COLLINS, 2004).

FIGURA 52 – ACHADOS MICROSCÓPICOS DO EXPERIMENTO DE ENSAIO COMETA. AS CÉLULAS PRESENTES NAS IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA FORAM USADAS COMO BASE PARA CLASSIFICAR OS GRAUS DE DANO NO DNA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM AS PARTÍCULAS E/OU AMBISSOME® OU MACRÓFAGOS SEM TRATAMENTO (USADO COMO CONTROLE NEGATIVO).



FONTE: A autora (2023).

A partir das observações de cada micrografia dos tratamentos feitos com a TCh, AgNP, TCh-AgNP e TCh-AgNP@Ac (2 , 2×10^{-1} , 2×10^{-2} , 2×10^{-3} e 2×10^{-4} $\mu\text{g mL}^{-1}$), foi calculada a frequência de aparecimento de cada tipo de dano entre os tratamentos (TABELA 17). Foi possível notar uma dependência da genotoxicidade em função da concentração, ou seja, danos do tipo 3 e 4 aparecem com mais frequência em

menores concentrações. Apesar de apresentar genotoxicidade, não foi observada uma evolução em citotoxicidade, pois conforme observado, a citotoxicidade em macrófagos foi inferior a 20%. Este dado sugere uma capacidade de proteção dos macrófagos pelas partículas, principalmente em concentrações maiores.

Em comparação com o tratamento com anfotericina lipossomal, nas células tratadas com Ambissome® foi observado em maioria células sem nenhum dano ao DNA, enquanto a ausência de tratamento (controle negativo) apresenta uma maior distribuição de danos causados pela eletroforese, sendo observados danos do Tipo 1 ao Tipo 4, que se apresenta em maior quantidade.

TABELA 17 – FREQUÊNCIA DO GRAU DE DANO AO DNA EM LINFÓCITOS USANDO ENSAIO COMETA

Frequência (%)					
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TCh				
	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
2	8,00	12,00	16,00	8,00	56,00
2×10^{-1}	11,11	14,81	22,22	18,52	33,33
2×10^{-2}	6,45	6,45	22,58	22,58	41,94
2×10^{-3}	37,50	16,67	16,67	8,53	20,83
2×10^{-4}	40,91	18,18	22,73	13,64	4,55
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TCh-AgNP				
	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
2	6,67	6,67	20,00	26,67	40,00
2×10^{-1}	0,00	5,88	17,65	29,41	47,06
2×10^{-2}	7,14	21,43	53,86	14,29	14,29
2×10^{-3}	11,11	11,11	27,78	16,67	33,33
2×10^{-4}	10,53	10,53	15,79	21,05	42,11
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TCh-AgNP@Ac				
	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
2	29,17	8,33	8,33	4,17	50,00
2×10^{-1}	31,43	40,00	20,00	2,86	5,71
2×10^{-2}	33,33	22,22	22,22	11,11	11,11
2×10^{-3}	0,00	5,88	11,76	29,41	52,94
2×10^{-4}	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AgNP				
	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4

2	5,56	5,56	5,56	38,89	44,44
2x10 ⁻¹	0,00	6,25	12,50	43,75	37,50
2x10 ⁻²	0,00	7,69	30,77	15,38	46,15
2x10 ⁻³	33,33	10,26	12,82	10,26	33,33
2x10 ⁻⁴	13,64	18,12	36,36	22,73	9,09
	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
Controle negativo	0,00	5,88	11,76	26,47	55,88
Ambissome®	71,43	25,00	3,57	0,00	0,00

FONTE: A autora (2023).

4.9.4 Atividade anti-*Leishmania* para formas promastigotas

A escolha da *Leishmania infantum* para o desenvolvimento dos testes celulares foi realizada após a conferência de compatibilidade das amostras de anticorpo e a cepa de *Leishmania infantum*. O anticorpo monoclonal anti *Leishmania donovani* utilizado no preparo das TCh-AgNPs@Ac foram adquiridos comercialmente os quais foram produzidos em camundongos e purificados por afinidade em coluna de proteína G. A sequência de nucleotídeos da proteína rK39 foi analisada pelo sistema BLAST e o alinhamento dos parâmetros obtidos foi de 100% quando comparados as cinesinas de *Leishmania infantum* (GenBank QHD44348), o que corroborou para a escolha da cepa.

Todas as amostras foram testadas para avaliar sua atividade anti-leishmania em formas promastigotas. A primeira etapa do experimento envolveu a determinação do tempo de tratamento das promastigotas com as TCh-AgNPs. Foram testados três tempos de tratamento: 2, 12 e 24 h. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 18.

TABELA 18 – ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DAS TCh-AgNPs PARA FORMAS PROMASTIGOTAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Taxa de mortalidade (%)		
	2 h	12 h	24 h
2	85,5%	88,7%	81,6%
2×10^{-1}	86,5%	91,5%	80,5%
2×10^{-2}	83,1%	71,6%	68,0%
2×10^{-3}	79,0%	69,4%	55,9%
1×10^{-3}	23,5%	19,1%	18,4%
2×10^{-4}	3,9%	2,9%	2,0%
CN	100,0%	100,0%	100,0%

FONTE: A autora (2023).

Seis concentrações diferentes foram testadas para determinar a concentração citotóxica média (CC_{50}) e observar o comportamento das amostras frente ao parasita. Para todos os tempos de tratamento foram observadas respostas semelhantes em termos de taxa de sobrevivência. A quantificação da taxa de sobrevivência foi obtida através da contagem dos parasitas vivos em câmara de Neubauer. Apesar da rapidez do método, a contagem em câmara de Neubauer apresenta algumas limitações, principalmente devido ao fato dos parasitas serem flagelados e por se movimentarem ao longo do campo de observação. Em duas horas de tratamento, foi observado promastigotas sem movimentação, o que indicaria a morte das promastigotas. Entretanto, após 12h de tratamento, a taxa de sobrevivência aumentou, sugerindo que as promastigotas estavam vivas apesar da ausência de movimentação. Para garantir a completa ação do tratamento, foi escolhido o tempo de 24h de tratamento para o restante dos experimentos. Os valores obtidos de CC_{50} para as TCh-AgNPs foi de 0,39, 0,59 e 0,81 ng mL^{-1} para 2, 12 e 24 h, respectivamente (TABELA 19). Analisando estatisticamente, os valores obtidos para os três tempos testados, não foi observado diferença estatística ($p < 0,05$). Desta forma, para garantir a morte das promastigotas especialmente devido ao método de contagem, foi escolhido o tempo de 24 h.

TABELA 19 – ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA E VALORES DE CC_{50} DAS TCh-AgNPs PARA FORMAS PROMASTIGOTAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

	2h	12h	24h
Inibição máxima (%)	102,3 ± 5,9	100,8 ± 8,7	98,6 ± 4,9
Inibição mínima (%)	12,9 ± 2,8	14,3 ± 4,8	22,0 ± 3,1
CC_{50} (ng mL⁻¹)	0,39355	0,59704	0,80538
log CC_{50}	-3,405	-3,224	-3,094
Intervalo de confiança de 95% (ng mL⁻¹)	0,1459 a 1,062	0,1131 a 3,153	0,2639 a 2,462

FONTE: A autora (2023).

Definido a escolha de 24h como tempo de tratamento, foram testadas as amostras de TCh, AgNPs, TCh-AgNPs e TCh-AgNPs@Ac para as formas promastigotas em diferentes concentrações. A partir do cálculo de inibição máxima, inibição mínima e CC_{50} , foi possível notar que a ordem crescente de CC_{50} foi TCh-AgNPs < TCh-AgNPs@Ac < AgNPs < TCh. Menores valores de CC_{50} demonstram maior eficiência do composto em matar o parasita. As TCh-AgNPs apresentaram boa resposta, com inibição máxima de $79 \pm 3,5\%$ das formas promastigotas (TABELA 20), porém não apresentando diferenças estatísticas dos outros tratamentos ($p < 0,05$).

Ovais et al. (2018) observou CC_{50} de $12,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra promastigotas e $17,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ para amastigotas de *L. tropica*, para AgNPs estabilizadas com extratos de planta. Shakeel et al., 2023 sintetizou nanopartículas de prata com quitosana tiolada e obteve o valor de $0,93 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a CI_{50} frente as formas amastigotas do parasita *L. tropica*. Neste caso, a modificação foi realizada com ácido tioglicólico, ácido com dois carbonos. Já para macrófagos, a viabilidade foi de 75%, ou seja, 25% de morte. Shahnaz et al., 2017 também sintetizaram quitosana tiolada, modificando a quitosana com ácido tioglicólico. Frente às formas amastigotas de *L. donovani*, o polímero formado obteve uma inibição de 84%, e a CC_{50} foi de $0,096 \mu\text{g mL}^{-1}$. Lima et al., 2017 observaram a atividade leishmanicida de nanopartículas de prata estabilizadas com quitosana. A CC_{50} obtida foi $3,91 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores obtidos para as CC_{50} das partículas neste trabalho foram na ordem de nanogramas e menores do que alguns estudos que usam o mesmo tipo de modificação polimérica ou a quitosana nativa, o que demonstra uma maior eficácia em relação a outras descritas na literatura.

Além disso, uma ação sinérgica pode ser observada, onde a TCh não apresentou boa atividade anti-*leishmania*, porém quando incorporado às TCh-AgNPs, sua atividade foi aumentada.

TABELA 20 – ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA E VALORES DE CC₅₀ DA TCh, AgNPs, TCh-AgNPs e TCh-AgNPs@Ac PARA FORMAS PROMASTIGOTAS

	TCh	AgNP	TCh-AgNP	TCh-AgNP@Ac
Inibição máxima (%)	59,49 ± 18,7	69,62 ± 4,9	79,02 ± 3,5	87,66 ± 13,5
Inibição mínima (%)	21,42 ± 8,2	41,47 ± 2,9	8,82 ± 9,2	17,06 ± 11,6
CC₅₀ (ng mL⁻¹)	140,2	56,73	1,364	17,91
log CC₅₀	-0,8533	-1,246	-2,865	-1,747
Intervalo de confiança de 95% (ng mL⁻¹)	0,1516 a 129600,0	2,796 a 1151,0	0,3426 a 5,428	0,4387 a 731,1

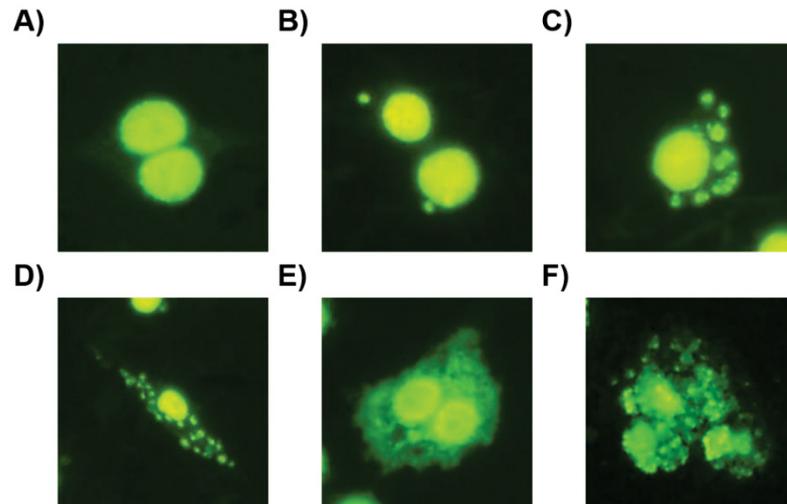
FONTE: A autora (2023).

4.9.5 Infecção experimental de macrófagos

Para verificar o comportamento das partículas frente à forma amastigota dos parasitas, macrófagos foram cultivados em lamínulas, contaminados com formas amastigotas e tratados com diferentes concentrações de partículas.

Nas observações das imagens de fluorescência, foi possível distinguir diferentes estágios de morfologia dos macrófagos, como demonstrado na Figura 53. Nas imagens obtidas de macrófagos sem contaminação, foi possível observar uma morfologia mais arredondada e bem homogênea, em condições adequadas para se proliferar e realizar o processo de mitose (FIGURA 53 – A). À medida que há a infecção, células contaminadas com baixos índices de contaminação iniciam o combate da infecção e já é possível visualizar a presença de formas amastigotas no citoplasma (FIGURA 53 – B, C e D). Com o aumento de leishmanias por células, o estresse aumenta, reduzindo a capacidade de replicação e fazendo com que o citoplasma se torne mais difuso (FIGURA 53– E), até o ponto de rompimento da membrana (FIGURA 53 - F), levando à um extravasamento dos parasitas.

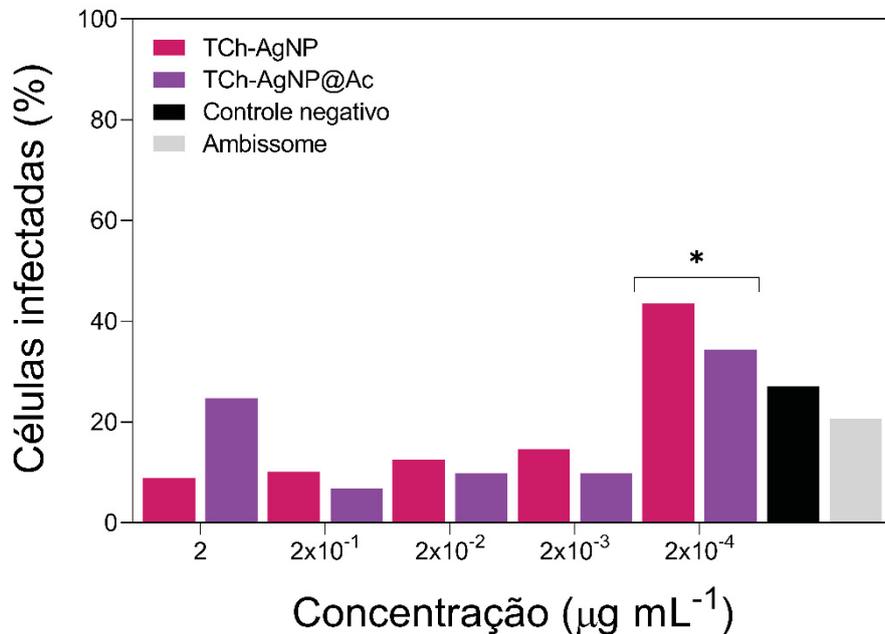
FIGURA 53 - IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE MACRÓFAGOS (A) SAUDÁVEIS EM FASE DE MITOSE, (B) CONTAMINADOS COM LEISHMANIA EM BAIXA TAXA DE INFECÇÃO, (C) COM AUMENTO DA TAXA DE CONTAMINAÇÃO POR LEISHMANIA, (D) COM ALTAS TAXAS DE INFECÇÃO, (E) COM DETERIORIZAÇÃO DA MORFOLOGIA CAUSADA PELA INFECÇÃO E (F) EM LISE CELULAR



FONTE: A autora (2023).

Após a captação das imagens, a procura por padrões celulares presentes na Figura 53 auxiliou na compreensão da resposta celular frente ao tratamento com as partículas. A porcentagem de células contaminadas foi determinada a partir da contagem de células contaminadas em relação ao número de células totais. Na Figura 54 são apresentadas as porcentagens de cada grupo. Comparando com o valor obtido para o tratamento com o Ambissome®, é possível notar que ambas as partículas testadas apresentaram menores porcentagens de células infectadas até a concentração de $2 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, a concentração de $2 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ para TCh-AgNPs e TCh-AgNPs@Ac apresentaram 1,4 e 2,1 vezes menos células infectadas, um achado importante que indica o potencial protetor destas partículas, reduzindo a contaminação.

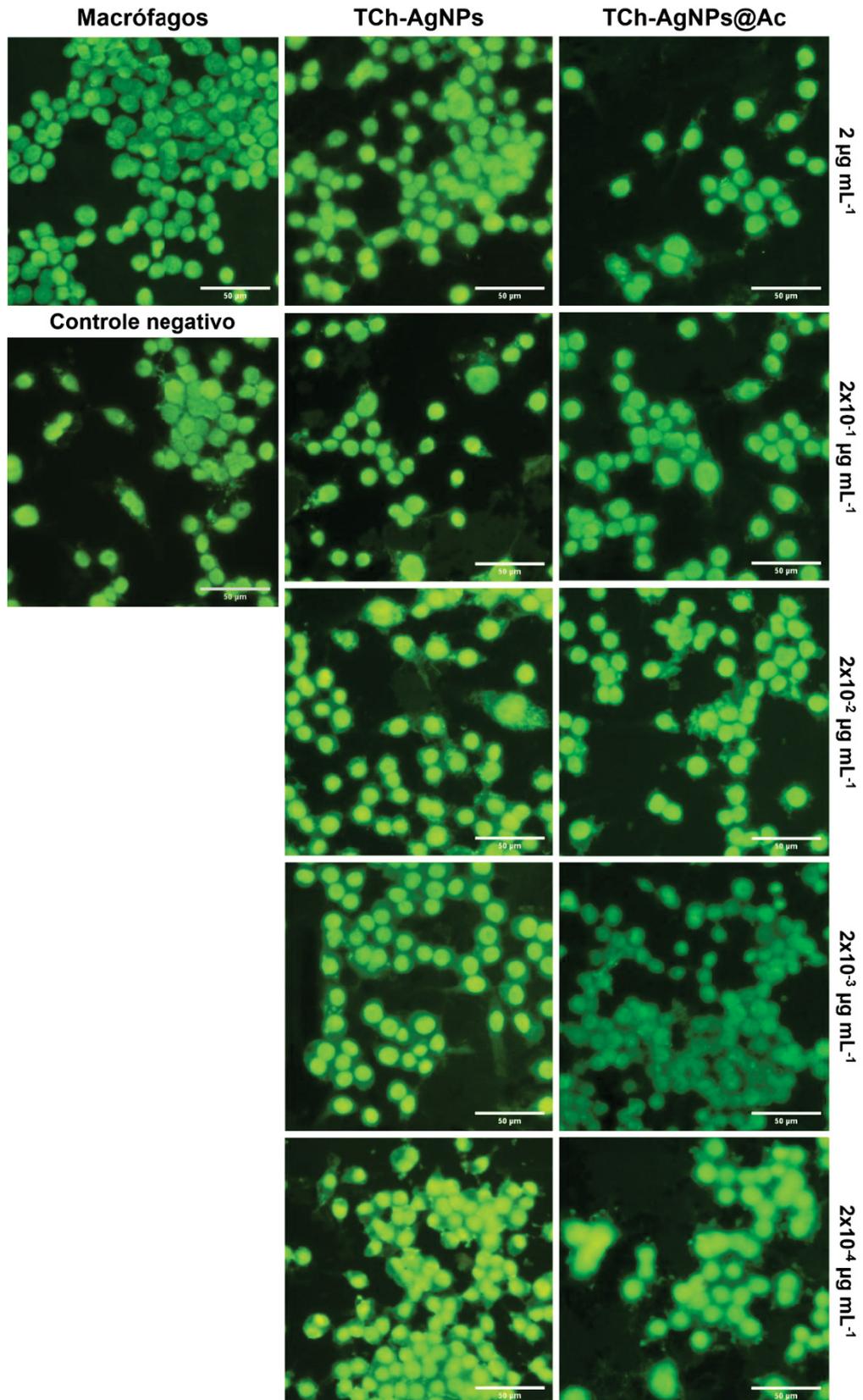
FIGURA 54 – PORCENTAGEM DE CÉLULAS INFECTADAS CONTADAS A PARTIR AS MICROGRAFIAS OBTIDAS DE MACRÓFAGOS CONTAMINADOS COM FORMAS AMASTIGOTAS E TRATADOS COM TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



FONTE: A autora (2023).

Além dos dados quantitativos, é possível observar o padrão de morfologia dos macrófagos nas micrografias. Os tratamentos realizados apresentaram resultados de concentração-dependentes. Em concentrações altas, há maior presença de macrófagos não danificados, com metabolismo saudável ou com baixa taxa de infecção. Na concentração de 2×10^{-4} $\mu\text{g mL}^{-1}$, as células tratadas apresentaram morfologias já em fase de lise, com alta taxa de infecção e o rompimento da membrana (FIGURA 55).

FIGURA 55 – IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE MACRÓFAGOS CONTAMINADOS COM FORMAS AMASTIGOTAS E TRATADOS COM TCh-AgNPs E TCh-AgNPs@Ac EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



FONTE: A autora (2023).

Observando os macrófagos tratados com TCh-AgNPs@Ac, devido ao pH da solução de partículas, houve uma alta toxicidade, e pouca presença de formas amastigotas, o que também foi observado na avaliação da viabilidade celular (FIGURA 51). Já para as TCh-AgNPs, desde a concentração mais alta, a estrutura esférica dos macrófagos foi mantida, provavelmente interferindo na patogenicidade da forma amastigota por haver manutenção da forma esférica com diminuição do dano na célula hospedeira. Durante o período de infecção, o meio de cultura foi trocado para que amastigotas viáveis pudessem fazer a conversão para formas promastigotas. Para ambas as partículas, a eficiência em reduzir a quantidade de formas amastigotas foi concentração-dependente, de forma que concentrações mais altas apresentaram uma menor quantidade de amastigotas, enquanto para baixas concentrações é possível observar formas promastigotas no exterior dos macrófagos, bem como amastigotas no citoplasma das células. Portanto, para os dois tratamentos, houve a presença de células pouco contaminadas em concentrações mais altas. Entretanto, em concentrações mais baixas de partículas, foram observadas altas taxas de infecção e maior presença de parasitas.

Apesar da presença dos parasitas, o tratamento com as nanopartículas foi capaz de reduzir os danos nos macrófagos contaminados e reduzir o número de amastigotas viáveis, o que indica um sucesso na aplicação destas partículas como potencial tratamento da leishmaniose, principalmente atuando como um agente protetor dos macrófagos.

Comparando os dois tipos de tratamento, apesar das TCh-AgNPs já se mostrarem uma boa opção como tratamento, pois apresentaram alta atividade anti-*leishmania* e proteção dos macrófagos, as TCh-AgNPs@Ac também apresentaram um perfil de atividade anti-*leishmania* efetivo. Esses dados sugerem que a ação sinérgica da quitosana + prata também pode ser observado para a quitosana tiolada + prata, pois observando a atividade anti-*leishmania* dos precursores e comparando com as TCh-AgNPs, houve um aumento considerável da atividade contra o parasita, sem afetar a viabilidade celular. Além disso, apesar das TCh-AgNPs@Ac não apresentarem um aumento considerável na atividade anti-*leishmania*, ainda apresentou bons resultados frente a contaminação.

Além das metodologias e resultados apresentados, foi também realizada a quantificação de nitrito para avaliar a ativação de macrófagos e o teste do DCFH

(Diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína) para observar a formação de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos frente a contaminação. Os resultados obtidos não indicaram a ativação dos macrófagos nem foi observada a formação de espécies reativas de oxigênio, indicando que talvez esse não seja o mecanismo de ação das nanopartículas. Entretanto, os resultados não são conclusivos e demandam mais experimentos para confirmação.

5 CONCLUSÕES

O polímero utilizado neste trabalho, a quitosana, foi purificada e caracterizada por cromatografia de exclusão de tamanho, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho. A quitosana foi tiolada com a inserção do ácido-3-mercaptopropânico, e a modificação foi caracterizada por ensaio de Ellman, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear, de forma que houve a confirmação da modificação.

O polímero modificado foi utilizado para capear nanopartículas de prata. A metodologia de síntese foi otimizada, e as partículas formadas foram caracterizadas por potencial zeta, UV-vis, e tiveram seus diâmetros quantificados por DLS e NTA. Os diâmetros obtidos foram maiores após a incorporação do polímero, seu potencial zeta foi menor, devido à incorporação de um polímero catiônico e o deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção demonstrou que a quitosana tiolada foi eficiente na estabilização das partículas.

Anticorpos anti-rK39 foram ligados à superfície das partículas e este sistema foi utilizado na detecção da proteína rK39 pela técnica de SPR. As partículas demonstraram melhor eficiência e um sinal 2,3 vezes maior na interação com o antígeno quando comparados ao anticorpo livre, além da presença das nanopartículas aprimorar a cinética da reação sendo observado equilíbrio mais rápido na sua presença. Além disso, a constante cinética de associação para a interação entre as TCh-AgNPs@Ac e a proteína rK39 foi de 2,2 vezes maior que para a interação com o anticorpo livre.

As partículas obtiveram sucesso na inibição de formas promastigotas e amastigotas, protegendo o macrófago dos danos causados pelos parasitas. Além disso, estudos de segurança foram realizados, de forma que as partículas não se mostraram tóxicas para hemácias e leucócitos humanos.

Portanto, as nanopartículas formadas apresentaram sucesso no diagnóstico da leishmaniose, e potencial aplicação como agente leishmanicida, comprovando a hipótese inicial do trabalho.

Considerando a facilidade de modificação de superfície das TCh-AgNPs, a alteração do anticorpo ancorado permite a ampliação de possibilidades de diagnóstico e tratamento, tornando as partículas uma plataforma com potencial para serem aplicadas para outras doenças.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. A.; DAS, S. S.; KHATOON, A.; et al. Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review. **Materials Science for Energy Technologies** **3**, v. 3, p. 756–769, 2020. The Authors. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.09.002>>. .
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 233, n. December 2020, p. 80–86, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.03.011>>. .
- AKMAZ, S.; DILAVER, E.; AD, J.; YASAR, M.; ERGUVEN, O. The Effect of Ag Content of the Chitosan-Silver Nanoparticle Composite Material on the Structure and Antibacterial Activity. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2013, p. 12–18, 2013.
- ALAQAD, K.; SALEH, T. A. Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis methods, Characterization Routes and Applications Towards Drugs. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 10, 2016.
- ALLAHVERDIYEV, A. M.; ABAMOR, E. S.; BAGIROVA, M.; et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 2705–2714, 2011.
- ANDERSSON, L.-O. Study of Some SilverThiol Complexes and Polymers: Stoichiometry and Optical Effects. **Journal of Polymer Science Part A**, v. 10, p. 1963–1973, 1972.
- ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. NIA B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- ASSCHE, T. VAN; DESCHACHT, M.; INOCÊNCIO, R. A.; MAES, L.; COS, P. Leishmania – macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 337–351, 2011.
- ASSOLINI, J. P.; CARLOTO, A. C. M.; BORTOLETI, B. T. DA S.; et al. Nanomedicine in leishmaniasis: A promising tool for diagnosis, treatment and prevention of disease - An update overview. **European Journal of Pharmacology**, v. 923, n. March, 2022.
- BARHOUM, A.; J. FORSTER, R. Label-free electrochemical immunosensor for picomolar detection of the cervical cancer biomarker MCM5. **Analytica Chimica Acta**, v. 1225, n. May, p. 340226, 2022. Elsevier B.V. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340226>>. .

BART, J.; TIGGELAAR, R.; YANG, M.; et al. Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 24, p. 3481–3488, 2009.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiomers : A new generation of mucoadhesive polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1569–1582, 2005.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; CLAUSEN, A. E.; HNATYSZYN, M. Thiolated polymers: Synthesis and in vitro evaluation of polymer-cysteamine conjugates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, n. 1–2, p. 185–194, 2001.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not ? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>>. .

BHATTARAI, B.; ZAKER, Y.; ATNAGULOV, A.; et al. Chemistry and Structure of Silver Molecular Nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 51, n. 12, p. 3104–3113, 2018.

BRAZ, R. F. S.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R. A.; et al. The sensitivity and specificity of Leishmania chagasi recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 4, p. 344–348, 2002.

BROWN, W. . Reduction of protein disulfide bonds by sodium borohydride. **Biochimica et biophysica acta**, v. 44, p. 365–367, 1960.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 392, n. 15, p. 951–970, 2018.

BYUN, I.; PARK, J.; KIM, B. Microcontact printing using flexible flat PDMS stamps with metal embedment. **2012 IEEE Nanotechnology Materials and Devices Conference, IEEE NMDC 2012**, p. 30–33, 2012. IEEE.

CABANE, E.; ZHANG, X.; LANGOWSKA, K.; PALIVAN, C. G.; MEIER, W. Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine. **Biointerphases**, v. 7, n. 9, p. 27, 2012.

CANAMA, G. J. C.; DELCO, M. C. L.; TALANDRON, R. A.; TAN, N. P. Synthesis of Chitosan-Silver Nanocomposite and Its Evaluation as an Antibacterial Coating for Mobile Phone Glass Protectors. **ACS Omega**, v. 8, p. 17699–17711, 2023.

CHADHA, U.; BHARDWAJ, P.; AGARWAL, RUSHALI; et al. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. **Journal of Industrial and**

- Engineering Chemistry**, v. 109, p. 21–51, 2022. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.010>>. .
- CHEN, Z.; ZHANG, X.; CAO, H.; HUANG, Y. Chitosan-capped silver nanoparticles as a highly selective colorimetric probe for visual detection of aromatic ortho-trihydroxy phenols. **Analyst**, v. 138, p. 2343–2349, 2013.
- CHIU, M. L.; GOULET, D. R.; TEPLYAKOV, A.; GILLILAND, G. L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. **Antibodies**, v. 8, n. 55, 2019.
- CHOUHDURY, H.; PANDEY, M.; LIM, Y. Q.; et al. Silver nanoparticles: Advanced and promising technology in diabetic wound therapy. **Materials Science & Engineering C**, v. 112, n. March, p. 110925, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110925>>. .
- CLOS, J.; GRÜNEBAST, J.; HOLM, M. Promastigote-to-Amastigote Conversion in *Leishmania* spp. — A Molecular View. **Pathogens**, v. 11, p. 1052–1065, 2022.
- COBLEY, C. M.; SKRABALAK, S. E.; CAMPBELL, D. J.; XIA, Y. Shape-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles for Plasmonic and Sensing Applications. **Plasmonics**, v. 4, p. 171–179, 2009.
- COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 249–261, 2004.
- CONDE, L.; MACIEL, G.; ASSIS, G. M. DE; et al. Humoral response in Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, , n. December, p. 1–8, 2022.
- COSTA-DA-SILVA, A. C.; NASCIMENTO, D. D. O.; FERREIRA, J. R. M.; et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Diseases**, v. 7, n. 54, p. 1–16, 2022.
- DAS, R.; NATH, S. S.; CHAKDAR, D.; GOPE, G.; BHATTACHARJEE, R. Synthesis of silver nanoparticles and their optical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 5, n. 4, p. 357–362, 2010.
- DESAI, R.; MANKAD, V.; GUPTA, S. K.; JHA, P. K. Size Distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment. **Nanoscience and Nanotechnology Letters**, v. 4, n. May, p. 30–34, 2012.
- DOBRYNIN, A. V.; COLBY, R. H.; RUBINSTEIN, M. Scaling Theory of Polyelectrolyte Solutions. **Macromolecules**, v. 28, n. 6, p. 1859–1871, 1995.
- EBRAHIMZADEH, M. ALI; HASHEMI, Z.; MOHAMMADYAN, M.; FAKHAR, M.; MORTAZAVI-DERAZKOLA, S. In vitro cytotoxicity against human cancer cell lines (MCF-7 and AGS), antileishmanial and antibacterial activities of green synthesized

silver nanoparticles using *Scrophularia striata* extract. **Surfaces and Interfaces**, v. 23, n. September 2020, p. 100963, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.100963>>. .

ENGLEBIENNE, P.; HOONACKER, A. VAN; VERHAS, M. Surface plasmon resonance: Principles, methods and applications in biomedical sciences. **Spectroscopy**, v. 17, n. 2–3, p. 255–273, 2003.

ESQUIVEL, R.; JUÁREZ, J.; ALMADA, M.; IBARRA, J.; VALDEZ, M. A. Synthesis and Characterization of New Thiolated Chitosan Nanoparticles Obtained by Ionic Gelation Method. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, p. 18 pages, 2015.

FANTI, J. R.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; et al. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. **Acta Tropica**, v. 178, n. May 2017, p. 46–54, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.027>>. .

FARAHMAND, M.; NAHREVANIAN, H. Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. **Iranian Biomedical Journal**, v. 20, n. 3, p. 128–134, 2016.

FEDERER, C.; KURPIERS, M.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiolated Chitosans: A Multi-talented Class of Polymers for Various Applications. **Biomacromolecules**, v. 22, p. 24–56, 2021.

FERNÁNDEZ, J. G.; FERNÁNDEZ-BALDO, M. A.; BERNI, E.; et al. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 9, p. 1306–1313, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.021>>. .

FERREIRA, E.; LIMA, J.; ALVES-BALVEDI, R. P.; et al. *Leishmania* spp. Detection Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor. **Proceedings**, v. 1, n. 536, p. 3–7, 2017.

FREEMAN, R. G.; GRABAR, K. C.; ALLISON, K. J.; et al. Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates. **Science**, v. 267, n. March, 1995.

FREITAS E SILVA, R. DE; STEBUT, E. VON. Unraveling the Role of Immune Checkpoints in Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–15, 2021.

GAO, C.; LIU, T.; DANG, Y.; et al. pH/redox responsive core cross-linked nanoparticles from thiolated carboxymethyl chitosan for in vitro release study of methotrexate.

Carbohydrate Polymers, v. 111, p. 964–970, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.012>>. .

GEDDA, M. R.; MADHUKAR, P.; SHUKLA, A.; et al. Nanodiagnostics in leishmaniasis: A new frontiers for early elimination. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 13, n. 2, p. 1–22, 2021.

GEDDA, M. R.; SINGH, O. P.; SRIVASTAVA, O. N.; SUNDAR, S. Therapeutic Leishmaniasis: Recent Advancement and Developments in Nanomedicines. **Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology**. p.195–220, 2019.

GENG, H.; VILMS PEDERSEN, S.; MA, Y.; et al. Noble Metal Nanoparticle Biosensors: From Fundamental Studies toward Point-of-Care Diagnostics. **Accounts of Chemical Research**, v. 55, n. 5, p. 593–604, 2022.

GUIMARÃES CARVALHO, S. F.; MOREIRA LEMOS, E.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 321–324, 2003.

GUTIÉRREZ, V.; SEABRA, A. B.; REGUERA, R. M.; KHANDARE, J.; CALDERÓN, M. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 1, p. 152–168, 2016.

HAN, B.; WEI, Y.; JIA, X.; XU, J.; LI, G. Correlation of the Structure, Properties, and Antimicrobial Activity of a Soluble Thiolated Chitosan Derivative. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 5, p. 2658–2667, 2010.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 87–94, 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00299352>>. .

HOMOLA, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 462–493, 2008.

HUANG, H.; LOVELL, J. F. Advanced Functional Nanomaterials for Theranostics. **Advanced Functional Materials**, v. 27, n. 2, 2017.

HUANG, T.; XU, X. H. N. Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 44, p. 9867–9876, 2010.

JACUMAZO, J.; CARVALHO, M. M. DE; PARCHEN, G. P.; et al. Development, characterization and antimicrobial activity of sodium dodecyl sulfate-polysaccharides capsules containing eugenol. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, 2020.

JACUMAZO, J.; PARCHEN, G. P.; GARCIA, M. J. B.; et al. Nectarine Coated with Biopolymeric Nanocapsules Containing Eugenol to Control Brown Rot. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1–10, 2023.

JASWAL, T.; GUPTA, J. A review on the toxicity of silver nanoparticles on human health. **Materials Today: Proceedings**, v. 81, p. 859–863, 2023. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.266>>. .

JIN, Y.; HU, H.; QIAO, M.; et al. pH-sensitive chitosan-derived nanoparticles as doxorubicin carriers for effective anti-tumor activity: preparation and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 184–191, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.032>>. .

JIRAWUTTHIWONGCHAI, J.; DRAEGER, G.; CHIRACHANCHAI, S. Rapid hybridization of chitosan-gold-antibodies via metal-free click in water-based systems: A model approach for naked-eye detectable antigen sensors. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 35, n. 13, p. 1204–1210, 2014.

KAFEDJIISKI, K.; FÖGER, F.; WERLE, M.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Synthesis and in vitro evaluation of a novel chitosan-glutathione conjugate. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 9, p. 1480–1488, 2005.

KAFEDJIISKI, K.; KRAULAND, A. H.; HOFFER, M. H.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Synthesis and in vitro evaluation of a novel thiolated chitosan. **Biomaterials**, v. 26, p. 819–826, 2005.

KAMMONA, O.; TSANAKTSIDOU, E. Nanotechnology-aided diagnosis, treatment and prevention of leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 605, p. 120761, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120761>>. .

KO, E.; CHO, H.; KIM, T.; YEA, C.; CHOI, J. Cell chip with a thiolated chitosan self-assembled monolayer to detect the effects of anticancer drugs on breast normal and cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 387–392, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.016>>. .

KOU, S. (GABRIEL); PETERS, L. M.; MUCALO, M. R. Chitosan: A review of sources and preparation methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 85–94, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>>. .

KUMAR-KRISHNAN, S.; PROKHOROV, E.; HERNÁNDEZ-ITURRIAGA, M.; et al. Chitosan / silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver

- nanoparticles and silver ions. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 242–251, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.066>>. .
- KUMARI, D.; PERVEEN, S.; SHARMA, R.; SINGH, K. Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics: An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 910, p. 174436, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174436>>. .
- LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQI, A. N.; et al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 1149–1158, 2003.
- LEE, D.; SHIRLEY, S. A.; LOCKEY, R. F.; MOHAPATRA, S. S. Thiolated chitosan nanoparticles enhance anti-inflammatory effects of intranasally delivered theophylline. **Respiratory Research**, v. 7, n. 112, p. 1–10, 2006.
- LEE, S. H.; JUN, B. H. Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019.
- LEICHNER, C.; JELKMANN, M.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiolated polymers: Bioinspired polymers utilizing one of the most important bridging structures in nature. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 151–152, p. 191–221, 2019.
- LIM, H. J.; SAHA, T.; TEY, B. T.; TAN, W. S.; OOI, C. W. Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 168, n. July, p. 112513, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112513>>. .
- LIMA, S.; GULLON, B.; CARDELLE-COBAS, A.; et al. Chitosan-based silver nanoparticles: A study of the antibacterial, antileishmanial and cytotoxic effects. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 32, n. 4, p. 397–410, 2017.
- LIU, M.; DU, H.; ZHANG, W.; ZHAI, G. Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: Design strategies and applications. **Materials Science & Engineering C**, v. 71, p. 1267–1280, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.030>>. .
- LYALINA, T. S.; LUNKOV, A. P.; VARLAMOV, V. P. Obtaining of Metal Nanoparticles Using Reducing Agents and Chitosan. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 97–104, 2022.
- MALINSKY, M. D.; KELLY, K. L.; SCHATZ, G. C.; DUYNE, R. P. VAN. Chain length dependence and sensing capabilities of the localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles chemically modified with alkanethiol self-assembled monolayers.

Journal of the American Chemical Society, v. 123, n. 7, p. 1471–1482, 2001.

MARTINS, B. R.; BARBOSA, Y. O.; ANDRADE, C. M. R.; et al. Development of an electrochemical immunosensor for specific detection of visceral leishmaniasis using gold-modified screen-printed carbon electrodes. **Biosensors**, v. 10, n. 8, p. 1–15, 2020.

MASUELLI, M. A. Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 37–43, 2014.

MAVANI, K.; SHAH, M. Synthesis of Silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent. **International Journal of Engineering Research & Technology**, v. 2, n. 3, p. 1–5, 2013.

MAYER, K. M.; HAFNER, J. H. Localized surface plasmon resonance sensors. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 6, p. 3828–3857, 2011.

MI, F.; WU, S.; ZHONG, W.; HUANG, C. Preparation of a silver nanoparticle-based dual-functional sensor using a complexation-reduction method. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, p. 21243–21253, 2015. Royal Society of Chemistry.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. , 2014. Disponível em:

<<http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415324A009%5Cnhttp://arxiv.org/abs/1011.1669%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1088/1751->

[8113/44/8/085201%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246403%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC424](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246403%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC424)>. .

MISCORIA, S. A.; DESBRIERES, J.; BARRERA, G. D.; LABBÉ, P.; RIVAS, G. A. Glucose biosensor based on the layer-by-layer self-assembling of glucose oxidase and chitosan derivatives on a thiolated gold surface. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 2, p. 137–144, 2006.

MIX, E.; GOERTSCHES, R.; ZETT, U. K. Immunoglobulins - Basic considerations. **Journal of Neurology**, v. 253, n. SUPPL. 5, p. 9–17, 2006.

MOHAMMADI, S.; KHAYATIAN, G. Colorimetric detection of biothiols based on aggregation of chitosan-stabilized silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 27–34, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.034>>. .

MORENO, M.; POW, P. Y.; TABITHA, T. S. T.; et al. Modulating release of ranibizumab and aflibercept from thiolated chitosan-based hydrogels for potential treatment of

- ocular neovascularization. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 14, n. 8, p. 913–925, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2017.1343297>>. .
- NAKAL-CHIDIAC, A.; GARCÍA, O.; GARCÍA-FERNANDES, L.; et al. Chitosan-stabilized silver nanoclusters with luminescent, photothermal and antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, 2020.
- NGUYEN, H. H.; PARK, J.; KANG, S.; KIM, M. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. **Sensors (Switzerland)**, v. 15, n. 5, p. 10481–10510, 2015.
- NGWULUKA, N. C.; OCHEKPE, N. A.; ARUOMA, O. I. Naturapolyceutics: The science of utilizing natural polymers for drug delivery. **Polymers**, v. 6, n. 5, p. 1312–1332, 2014.
- NIEDZIAŁKOWSKI, P.; BOJKO, M.; RYL, J.; et al. Ultrasensitive electrochemical determination of the cancer biomarker protein sPD-L1 based on a BMS-8-modified gold electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 139, 2021.
- O'BRIEN, J. C.; JONES, V. W.; PORTER, M. D.; MOSHER, C. L.; HENDERSON, E. Immunosensing platforms using spontaneously adsorbed antibody fragments on gold. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 703–710, 2000.
- OLIVEIRA, E.; NÚÑEZ, C.; SANTOS, H. M.; et al. Revisiting the use of gold and silver functionalised nanoparticles as colorimetric and fluorometric chemosensors for metal ions. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 212, p. 297–328, 2015.
- OMS, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. (Acessado 28 Setembro 2022).
- OMS, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. (Acessado 8 Outubro 2023).
- OVAIS, M.; KHALIL, A. T.; RAZA, A.; et al. Multifunctional theranostic applications of biocompatible green-synthesized colloidal nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 10, p. 4393–4408, 2018. Applied Microbiology and Biotechnology.
- OVAIS, M.; NADHMAN, A.; KHALIL, A. T.; et al. Biosynthesized colloidal silver and gold nanoparticles as emerging leishmanicidal agents: an insight. **Nanomedicine**, v. 12, n. 24, p. 2807–2819, 2017.
- PALMBERGER, T. F.; HOMBACH, J.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiolated chitosan: Development and in vitro evaluation of an oral delivery system for acyclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 348, n. 1–2, p. 54–60, 2008.

PALUS, J.; DZIUBALTOWSKA, E.; RYDZYNSKI, K. DNA damage detected by the comet assay in the white blood cells of workers in a wooden furniture plant. **Mutation Research**, v. 444, p. 61–74, 1999.

PASQUA, A. J. DI; MISHLER, R. E.; SHIP, Y. L.; DABROWIAK, J. C.; ASEFA, T. Preparation of antibody-conjugated gold nanoparticles. **Materials Letters**, v. 63, n. 21, p. 1876–1879, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2009.05.070>>. .

PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 417–426, 2015. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641115003367?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/11/2018.

PERINOTO, Â. C.; MAKI, R. M.; COLHONE, M. C.; et al. Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: Innovations in bioanalytics for a neglected disease. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 23, p. 9763–9768, 2010.

PIETERS, R. J. Maximising multivalency effects in protein – carbohydrate interactions. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 2013–2015, 2009.

PRADHAN, S.; SCHWARTZ, R. A.; PATIL, A.; GRABBE, S.; GOLDUST, M. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516–521, 2022.

QIAO, X.; ZHANG, X.; TIAN, Y.; MENG, Y. Progresses on the theory and application of quartz crystal microbalance. **Applied Physics Reviews**, v. 3, n. 031106, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/1.4963312>>. .

QUINN, J. F.; WHITTAKER, R.; DAVIS, T. P.; QUINN, J. F.; WHITTAKER, M. R. Glutathione responsive polymers and their application in drug delivery systems. **Polymer Chemistry**, v. 8, p. 97–126, 2017. Royal Society of Chemistry.

REGENMORTEL, M. H. V. VAN. **HIV/AIDS: Immunochemistry , Reductionism and Vaccine Design**. 2019.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006. Pergamon. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670006000530?via%3Dihub>>. Acesso em: 21/5/2018.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v.

5, p. 267–276, 1999a.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, p. 7029–7032, 1999b.

RYMAN, J. T.; MEIBOHM, B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 6, p. 576–588, 2017.

SAMUEL, V. R.; RAO, K. J. A review on label free biosensors. **Biosensors and Bioelectronics: X**, v. 11, n. June, p. 100216, 2022. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100216>>. .

SANCHEZ, M. C. A.; CELESTE, B. J.; LINDOSO, J. A. L.; et al. Performance of rK39-based immunochromatographic rapid diagnostic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis using whole blood , serum and oral fluid. **Plos One**, v. 2, p. 1–19, 2020.

SANTOS, S. S.; ARAÚJO, R. V. DE; GIAROLLA, J.; SEOUD, O. EL; FERREIRA, E. I. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 4, p. 105906, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105906>>. .

SAREMI, S.; ATYABI, F.; AKHLAGHI, S. P.; OSTAD, S. N.; DINARVAND, R. Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: Preparation, in vitro and ex vivo evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 119–128, 2011.

SCHASFOORT, R. B. M. Chapter 1. Introduction to Surface Plasmon Resonance. **Handbook of Surface Plasmon Resonance**, p. 1–26, 2017.

SENTHILKUMAR, P.; YASWANT, G.; KAVITHA, S.; et al. Preparation and characterization of hybrid chitosan-silver nanoparticles (Chi-Ag NPs); A potential antibacterial agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 290–298, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.234>>. .

SHAHNAZ, G.; EDAGWA, B. J.; MCMILLAN, J.; et al. Development of mannose-anchored thiolated amphotericin B nanocarriers for treatment of visceral leishmaniasis. **Nanomedicine**, v. 12, n. 2, p. 99–115, 2017.

SHAKEEL, M.; HASSAN, M.; SHOAIB, H.; et al. Emulgel-loaded mannosylated thiolated chitosan-coated silver nanoparticles for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 227, n. July 2022, p. 1293–1304, 2023.

SHANMUGARAJ, K.; ILANCHELIAN, M. Colorimetric determination of sulfide using

- chitosan-capped silver nanoparticles. **Microchim Acta**, v. 183, p. 1721–1728, 2016.
- SHARMA, P.; MOURYA, M.; CHOUDHARY, D.; et al. Thiol terminated chitosan capped silver nanoparticles for sensitive and selective detection of mercury (II) ions in water. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 268, p. 310–318, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.121>>. .
- SHEHABELDINE, A. M.; SALEM, S. S.; ALI, O. M.; et al. Multifunctional Silver Nanoparticles Based on Chitosan : Wound-Healing Activities. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 612–628, 2022.
- SILVA, D. A. DA; MADEIRA, M. DE F.; ABRANTES, T. R.; FILHO, C. J. DE L. B.; FIGUEIREDO, F. B. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 252–253, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.010>>. .
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Infrared Spectrometry. **Analytical Chemistry**, 2005.
- SINGH, D.; RASHID, M.; HALLAN, S. S.; et al. Pharmacological evaluation of nasal delivery of selegiline hydrochloride-loaded thiolated chitosan nanoparticles for the treatment of depression. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 865–877, 2016.
- SONG, K. C.; LEE, S. M.; PARK, T. S.; LEE, B. S. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 26, n. 1, p. 153–155, 2009.
- SOUTO, D. E. P.; FONSECA, A. M.; BARRAGAN, J. T. C.; et al. SPR analysis of the interaction between a recombinant protein of unknown function in *Leishmania infantum* immobilised on dendrimers and antibodies of the visceral leishmaniasis : A potential use in immunodiagnosis. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 70, p. 275–281, 2015. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.034>>. .
- SOUTO, D. E. P.; VOLPE, J.; GONÇALVES, C. D. C.; RAMOS, C. H. I.; KUBOTA, L. T. A brief review on the strategy of developing SPR-based biosensors for application to the diagnosis of neglected tropical diseases. **Talanta**, v. 205, n. April, p. 120122, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120122>>. .
- SOUZA, A. DE; MARINS, D. S. S.; MATHIAS, S. L.; et al. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 421–431, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.018>>. .

SUDHAKAR, S.; CHANDRAN, S. V.; SELVAMURUGAN, N.; NAZEER, R. A. Biodistribution and pharmacokinetics of thiolated chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 281–288, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.079>>. .

SULLIVAN, C. K. O.; GUILBAULT, G. G. Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, p. 663–670, 1999.

SWIERCZEWSKA, M.; HAN, H. S.; KIM, K.; PARK, J. H.; LEE, S. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, p. 70–84, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.015>>. .

TAHERI, R. A.; REZAYAN, A. H.; RAHIMI, F.; MOHAMMADNEJAD, J.; KAMALI, M. Evaluating the Potential of an Antibody Against Recombinant OmpW Antigen in Detection of *Vibrio cholerae* by Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor. **Plasmonics**, v. 12, n. 5, p. 1493–1504, 2017. Plasmonics.

TARANEJOO, S.; CHANDRASEKARAN, R.; CHENG, W.; HOURIGAN, K. Bioreducible PEI-functionalized glycol chitosan: A novel gene vector with reduced cytotoxicity and improved transfection efficiency. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 160–168, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.080>>. .

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 4, n. 5, p. 657–667, 2003.

TAYLOR, H. P.; ARMSTRONG, S. J.; DIMMOCK, N. J. Quantitative Relationships between an Influenza Virus and Neutralizing Antibody. **Virology**, v. 159, p. 288–298, 1987.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HAWKINS BYRNE, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder #26616. , p. 1–2, 2013. Disponível em: <<http://www.biocenter.hu/pdf/26616.pdf>>. .

TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O.; DURÁN, N.; et al. Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment.

Journal of Hazardous Materials, v. 390, n. November 2019, p. 121974, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121974>>. .

TRAN, H. V.; TRAM, L. D.; BA, C. T.; et al. Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan- based silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 360, n. 1–3, p. 32–40, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.02.007>>. .

TUTAJ, K.; SZLAZAK, R.; SZALAPATA, K.; et al. Amphotericin B-silver hybrid nanoparticles: synthesis , properties and antifungal activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1095–1103, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.12.378>>. .

VASIMALAI, N.; ABRAHAM JOHN, S. Biopolymer capped silver nanoparticles as fluorophore for ultrasensitive and selective determination of malathion. **Talanta**, v. 115, p. 24–31, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.033>>. .

VERMELHO, A. B.; SUPURAN, C. T.; CARDOSO, V.; et al. Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. Capítulo 15: Leishmaniasis: Possible New Strategies for Treatment. **Leishmaniasis - Trends in epidemiology, diagnosis and treatment scheme**. p.351–375, 2015.

WANG, W.; BO, S.; LI, S.; QIN, W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, n. 5, p. 281–285, 1991.

WAYS, T. M. M.; LAU, W. M.; KHUTORANSKIY, V. V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. **Polymers**, v. 10, n. 267, 2018.

WEI, D.; QIAN, W. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, p. 136–142, 2008.

WELCH, N. G.; SCOBLE, J. A.; MUIR, B. W.; PIGRAM, P. J. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). **Biointerphases**, v. 12, n. 2, p. 02D301, 2017.

WIESING, U. Theranostics: is it really a revolution? Evaluating a new term in medicine. **Medicine, Health Care and Philosophy**, v. 22, n. 4, p. 593–597, 2019. Springer Netherlands. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11019-019-09898-3>>. .

YANG, Y.; WANG, S.; WANG, Y.; et al. Advances in self-assembled chitosan

- nanomaterials for drug delivery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1301–1316, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.007>>. .
- YOUNG, M. B.; OH, B. K.; LEE, W.; WON, H. L.; CHOI, J. W. Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 1, p. 103–110, 2005.
- ZAHIR-JOUZDANI, F.; MAHBOD, M.; SOLEIMANI, M.; et al. Chitosan and thiolated chitosan: Novel therapeutic approach for preventing corneal haze after chemical injuries. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, n. September 2017, p. 42–49, 2018.
- ZENG, S.; YU, X.; LAW, W. C.; et al. Size dependence of Au NP-enhanced surface plasmon resonance based on differential phase measurement. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 176, p. 1128–1133, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.073>>. .
- ZHANG, D.; SUN, Y.; WU, Q.; et al. Enhancing sensitivity of surface plasmon resonance biosensor by Ag nanocubes/chitosan composite for the detection of mouse IgG. **Talanta**, v. 146, p. 364–368, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.050>>. .
- ZHOU, Y. T.; HE, W.; LO, Y. M.; et al. Effect of silver nanomaterials on the activity of thiol-containing antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 32, p. 7855–7862, 2013.
- ZIENKIEWICZ-STRZAŁKA, M.; DERYŁO-MARCZEWSKA, A. Small AgNP in the biopolymer nanocomposite system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 1–30, 2020.