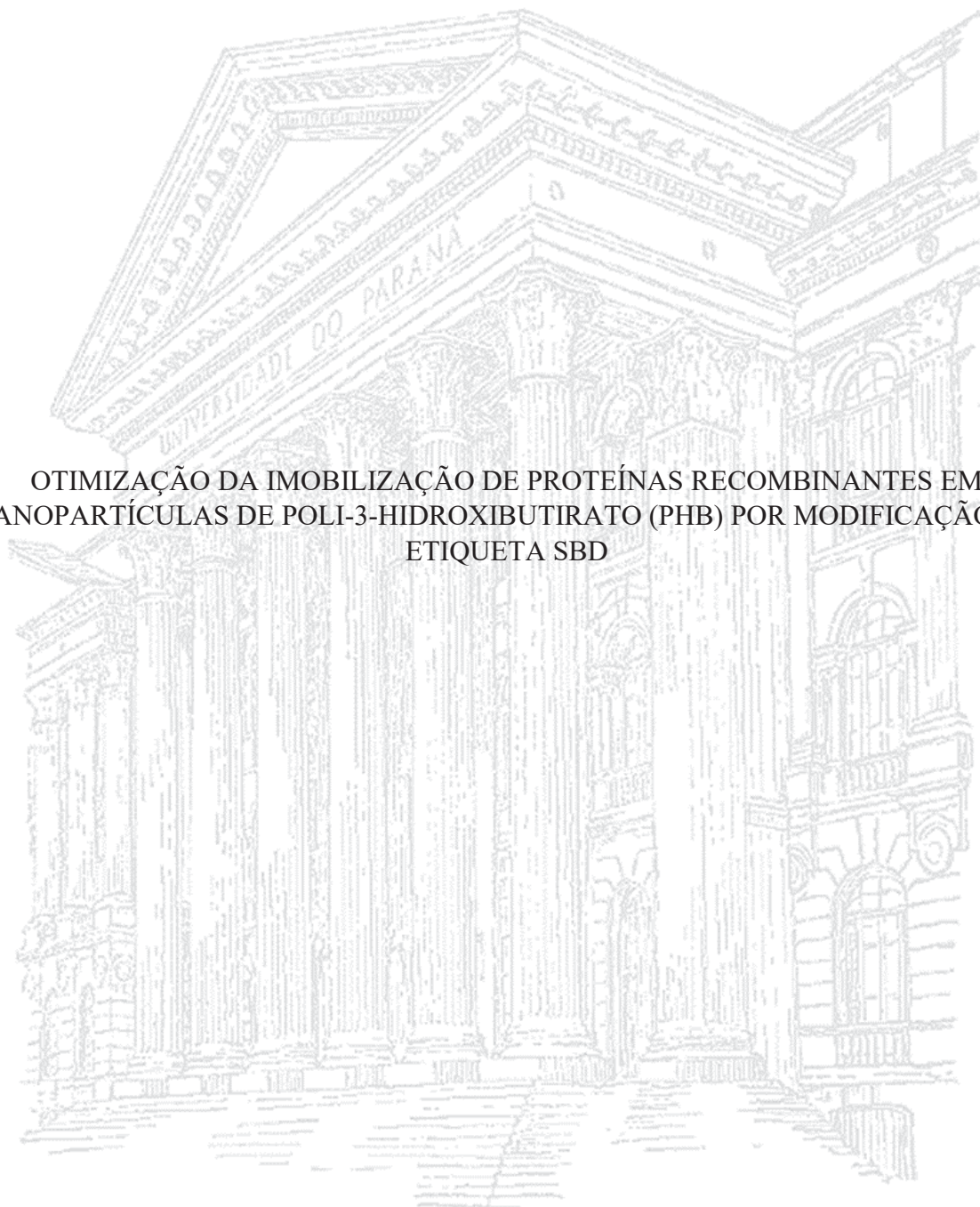


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ SAMPAIO

OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM
NANOPARTÍCULAS DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR MODIFICAÇÃO DA
ETIQUETA SBD



CURITIBA

2023

ANDRÉ SAMPAIO

OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM
NANOPARTÍCULAS DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR MODIFICAÇÃO DA
ETIQUETA SBD

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica) pelo Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Sampaio, André

Otimização da imobilização de proteínas recombinantes em nanopartículas de poli-3-hidroxi-butarato (PHB) por modificação da etiqueta SBD / André Sampaio. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

1. Nanopartículas. 2. Vacinologia. 3. Proteínas recombinantes. I. Souza, Emanuel Maltempi de, 1964-. II. Müller-Santos, Marcelo, 1979-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDRÉ SAMPAIO** intitulada: **OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM NANOPARTÍCULAS DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR MODIFICAÇÃO DA ETIQUETA SBD**, sob orientação do Prof. Dr. EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 30 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica
03/11/2023 14:29:57.0

EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
09/11/2023 20:15:26.0

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -UFPR)

Assinatura Eletrônica
15/12/2023 18:10:31.0

WANDERSON DUARTE DA ROCHA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
01/11/2023 16:26:01.0

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS
Coordenador(a) (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 325433

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 325433

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha família e meus familiares, mais especialmente a minha mãe Aglair e meu pai Sergio, por todo o apoio incondicional em todas as etapas da minha vida e, neste caso, também da minha vida acadêmica. Mãe, te agradeço por todos os conselhos, amor e conhecimentos pessoais cedidos e compartilhados nos momentos de sufoco, desespero, frustrações e também nos momentos de conquista; por toda força em me manter confiante e acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis de prosseguir e nos momentos mais nebulosos de tamanha incerteza. Por compartilhar sua felicidade comigo nos momentos que podia contar para alguém sobre cada conquista acadêmica, mínima que fosse, cada resultado positivo, cada etapa concluída ao longo desse processo acadêmico. Te agradeço eternamente por ser meu porto seguro e saiba que tenho orgulho de ser seu filho.

Aos meus amigos de infância, do ensino médio e da vida Lucas, Isabella, Bruna e Renã pela amizade, companheirismo, pelos momentos de descontração, pelos roles e por todos os momentos felizes juntos, que, de certo modo, tornaram as etapas mais difíceis mais tranquilas de se passar ao lado de vocês.

Ao meu orientador prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza e ao meu coorientador prof. Dr. Marcelo Muller dos Santos pela orientação e paciência, por me guiarem no delineamento do meu projeto, por todos os conselhos e ensinamentos prestados, pelas reuniões e discussões enriquecedoras dos meus resultados e principalmente pela oportunidade de me aceitarem e acolherem como seu aluno, mesmo tendo raso conhecimento prévio da área antes de ingressar ao PPG.

À prof^a. Dr^a. Dayane Alberton, ao Dr. Luis Paulo Silveira Alves, ao Dr. Manuel José Piñero Gavidia e à Msc. Maria Luiza Terribile Budel por todo o conhecimento compartilhado nos meus primeiros experimentos de bancada com biologia molecular, pela paciência de me ensinarem na prática as técnicas da clonagem molecular.

À Dr^a. e colega Maritza Todo Bom e ao Dr. Ryu Massaki por todo o conhecimento compartilhado com a manipulação de proteínas recombinantes e pelos conselhos nos testes de imobilização, pelas conversas no laboratório, pelas trocas, pelos almoços juntos e por toda a ajuda durante o projeto.

Ao prof. Dr. Guilherme Picheth e a Dr^a. Isabela Pereira Dias pelas reuniões, conselhos e parcerias na realização dos resultados de DLS, microscopias (AFM, MET, MEV e confocal), SPR e SAXS. Em especial, aos auxílios nos estudos de isoterma de adsorção. Gratidão.

À prof^a. Dr^a. Edileusa Marques pelos conselhos e dicas ao longo do projeto e especialmente por me auxiliar com os experimentos de expressão e purificação de proteínas e com meus resultados do MALDI-TOF.

Ao mestrando Brenno Wendler de Miranda por ter cedido um plasmídeo para expressão de uma das minhas proteínas utilizadas no projeto.

À querida Dona Rose pelos auxílios nas etapas básicas e iniciais do meu projeto, cedendo conhecimentos para o preparo de soluções, reagentes, meios de cultura, rotina de laboratório, biossegurança e sequenciamento dos plasmídeos.

Aos colegas do NFN e do PPG-Ciências Bioquímica pelas conversas e dicas no corredor no dia a dia de rotina de laboratório, pelas disciplinas cursadas juntos, pelos almoços, pelas risadas no cafezinho e pelos roles e memes compartilhados.

À agência financiadora CAPES pela concessão de bolsa e por compreender o período de pandemia pelo qual passamos e, assim, ter concedido 6 meses adicionais para o desenvolvimento da minha pesquisa.

E ao programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica), ao setor de Ciências Biológicas e à UFPR pela infraestrutura e suporte acadêmico.

RESUMO

Nas últimas décadas, o uso de nanopartículas (NPs) tem crescido exponencialmente em diversas áreas da biotecnologia, especialmente na vacinologia. O poliéster biológico conhecido como poli-3-hidroxi-butilato (PHB) tem se destacado como um material alternativo para produção de nanopartículas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de funcionalização e custo acessível. Para ancorar os antígenos ao PHB, o peptídeo SBD (*Substrate Binding Domain*) derivado de uma PHB depolimerase pode ser utilizado como uma proteína de fusão. Entretanto, é importante observar que o conteúdo de cisteína (Cys) e o tamanho da etiqueta podem influenciar na eficácia da imobilização da proteína de interesse nas nanopartículas. Nesse contexto, o principal objetivo deste estudo foi investigar se a remoção total ou parcial de dois resíduos de Cys da cauda SBD afeta a imobilização de proteínas nas nanopartículas de PHB. Para alcançar esse objetivo, foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) quatro proteínas diferentes: sfGFP-SBD, que consiste na proteína verde fluorescente (sfGFP) fundida geneticamente à etiqueta SBD não modificada (selvagem); sfGFP-sSBD, proteína fluorescente verde (sfGFP) fundida à etiqueta SBD deletada de um resíduo de Cys e mais outros 8 resíduos de aminoácidos N-terminais; sfGFP-sSBDA, uma subvariante de sfGFP-sSBD com a substituição C487A; e sfGFP, que serviu como controle negativo. A imobilização dessas proteínas purificadas foi realizada misturando um volume fixo de NP de PHB com concentrações crescentes de proteína, sob agitação e temperatura constantes por 20 minutos. As frações não ligadas e imobilizadas foram quantificadas por ensaios de fluorescência e mensuradas através de parâmetros de isotermas de adsorção e através de estimativa de proteína no gel de SDS-PAGE por meio de densitometria de banda. Os resultados indicam que a variante sfGFP-sSBD apresenta uma eficiência de imobilização cerca de duas vezes maior em NP-PHB do que sfGFP-SBD e quase quatro vezes maior do que sfGFP-sSBDA. Esses resultados também são confirmados pelas análises de dessorção, que mostram que a mesma proteína tem menor tendência a se desprender das nanopartículas após exposição a detergentes. Portanto, conclui-se que a etiqueta variante sSBD demonstra uma maior afinidade de imobilização e estabilidade em comparação com as outras etiquetas testadas. Esses resultados podem ter implicações importantes para futuras plataformas de imunização que utilizam a etiqueta SBD para ancoragem em nanopartículas.

Palavras-chave: nanopartículas; Poli-3-hidroxi-butilato; sfGFP; *Substrate Binding Domain*; imobilização.

ABSTRACT

In recent decades, the use of nanoparticles (NPs) has grown exponentially in several areas of biotechnology, such as vaccinology. The biological polyester known as poly-3-hydroxybutyrate (PHB) has stood out as an alternative material for the production of nanoparticles due to its biocompatibility, biodegradability, functionalization capacity and affordable cost. To anchor antigens to the PHB, the SBD (Substrate Binding Domain) peptide derived from a PHB depolymerase can be used as a binding tag. However, it is important to note that the cysteine (Cys) content and the size of the tag can influence the effectiveness of retention of the protein of interest in the nanoparticles. In this context, the main objective of this study was to investigate whether the total or partial removal of two Cys residues from the SBD tail affects the attachment of proteins to PHB nanoparticles. To achieve this objective, four different proteins were expressed in *E. coli* BL21 (DE3): sfGFP-SBD, which consists of green fluorescent protein (sfGFP) genetically fused to the unmodified (wild-type) SBD tag; sfGFP-sSBD, green fluorescent protein (sfGFP) fused to the SBD tag excluded from a Cys deletion plus 8 other N-terminal amino acid residues; sfGFP-sSBDA, a subvariant of sfGFP-sSBD with the C487A substitution; and sfGFP, which served as a negative control. Immobilization of these purified proteins was performed by mixing a fixed volume of PHB NP with increasing concentrations of protein, under constant stirring and temperature for 20 minutes. The unbound and immobilized fractions were quantified by fluorescence assays and measured using adsorption isotherm parameters and through protein estimation in the SDS-PAGE gel using band densitometry. The results indicate that the sfGFP-sSBD variant presents an immobilization efficiency about two times higher in NP-PHB than sfGFP-SBD and almost four times higher than sfGFP-sSBDA. These results are also confirmed by desorption analyses, which show that the same protein has a lower tendency to detach from nanoparticles after exposure to detergents. Therefore, it is concluded that the sSBD variant demonstrates a greater layer of immobilization and stability compared to the other tags tested. These results may have important implications for future immunization platforms that utilize the SBD tag for nanoparticle anchoring.

Keywords: nanoparticles; Poly-3-hydroxybutyrate; sfGFP; Substrate Binding Domain; immobilization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Nanopartículas na produção de vacinas.....	21
3.1.1 Nanoescala e nanopartículas	21
3.1.2 Vacinas à base de nanopartículas	24
3.1.3 Nanopartículas poliméricas	25
3.2 Nanopartículas de poli-3-hidroxi- butirato (PHB)	27
3.2.1 Polihidroxialcanoatos	27
3.2.2 Poli-3-hidroxi- butirato (PHB)	31
3.2.3 Biossíntese e degradação de poli-3-hidroxi- butirato (PHB).....	32
3.2.4 Aplicações biotecnológicas do poli-3-hidroxi- butirato (PHB).....	36
3.3 Técnicas de funcionalização de proteínas em nanoesferas	40
3.4 Proteínas de ancoragem (<i>tags</i>) como técnicas de funcionalização	43
3.5 Domínio SBD (<i>Substrate Binding Domain</i>).....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 MÉTODOS DE MICROBIOLOGIA	49
4.1.1 Estirpes bacterianas	49
4.1.2 Meios de cultura, antibióticos e estoque de microrganismos	49
4.1.3 Preparo de células competentes.....	50
4.2 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA.....	51
4.2.1 Plasmídeos utilizados nesse trabalho	51
4.2.2 Extração de DNA plasmidial (minipreparação)	51
4.2.3 Transformação bacteriana por choque térmico	52

4.2.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose	53
4.2.5 Digestão de DNA plasmidial com endonucleases.....	53
4.2.6 Construção dos plasmídeos recombinantes para expressão das variantes.....	54
4.2.7 Construção dos plasmídeos recombinantes para expressão dos controles	54
4.3 EXPRESSÃO E MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	55
4.3.1 Superexpressão das proteínas recombinantes.....	55
4.3.2 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE)	56
4.3.3 Dosagem colorimétrica de proteínas	56
4.3.4 Fluorimetria para dosagem de proteínas	56
4.3.5 Purificação de proteínas recombinantes com 6His-tag	57
4.3.6 Purificação da proteína controle sfGFP.....	58
4.3.7 Diálise das proteínas recombinantes	59
4.3.8 Identificação de proteínas recombinantes por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS)	59
4.4 FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PHB.....	60
4.4.1 Obtenção de nanopartículas de PHB.....	60
4.4.2 Caracterização físico-química de nanopartículas de PHB.....	61
4.4.3 Funcionalização de nanopartículas de PHB e eficiência de imobilização.....	61
4.4.4 Análise densitométrica da imobilização de proteínas em nanopartículas de PHB.....	63
4.4.5 Caracterização das nano e micropartículas funcionalizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e de Varredura (MEV)	63
4.4.6 Caracterização das micropartículas funcionalizadas por Microscopia Confocal	64
4.4.7 Caracterização das nanopartículas funcionalizadas por Microscopia de Força Atômica (AFM)	65
4.4.8 Análise por Superfície de Ressonância Plasmônica (SPR) das nanopartículas funcionalizadas	65
4.4.9 Análise por Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) das nanopartículas funcionalizadas de sfGFP-SBD.....	66
4.4.10 Análise de dessorção das proteínas nas nanopartículas.....	66

4.5 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	67
4.5.1 Previsão estrutural de proteínas recombinantes utilizando o software RoseTTA Fold67	
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 Superexpressão e purificação da proteína sfGFP	67
5.2 Superexpressão e purificação da proteína sfGFP-SBD	72
5.3 Superexpressão e purificação das variantes SBD.....	75
5.4 Caracterização morfológica das nanopartículas de PHB	83
5.5 Funcionalização das proteínas recombinantes em nanopartículas.....	85
5.6 Análise densitométrica da imobilização das proteínas nas nanopartículas	94
5.7 Caracterização morfológica das nanopartículas funcionalizadas por proteínas recombinantes por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e de Varredura (MEV)	101
5.8 Caracterização morfológica das nanopartículas funcionalizadas por proteínas recombinantes por Microscopia Confocal (CM)	104
5.9 Caracterização topográfica das nanopartículas funcionalizadas por Microscopia de Força Atômica acoplada a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (AFM-FTIR).....	107
5.10 Caracterização física da funcionalização das nanopartículas de PHB por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)	110
5.11 Análise de agregação das proteínas recombinantes por SAXS.....	115
5.12 Análise por SPR da interação das proteínas recombinantes ao PHB.....	118
5.13 Análise de dessorção das proteínas recombinantes das nanopartículas funcionalizadas	121
5.14 Previsão estrutural da conformação das proteínas recombinantes	125
6. CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS	131
ANEXO I.....	146
ANEXO II.....	147

ANEXO III	148
ANEXO IV	149

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento exponencial de publicações sobre os potenciais usos do emprego de nanopartículas na biotecnologia nos últimos 20 anos	22
Figura 2. Representação esquemática da nanoescala (1-100 nm).....	23
Figura 3. Esquema ilustrativo de carreamento de biomoléculas por nanopartículas poliméricas.	26
Figura 4. Estrutura geral de um R-hidroxiacil-CoA (monômero).....	29
Figura 5. Estrutura geral de um polihidroxiacanoato	30
Figura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de grânulos de PHB estocados no citoplasma da estirpe KT2440 de <i>Pseudomonas putida</i>	32
Figura 7. Via biossintética de PHB em bactérias	33
Figura 8. Organização genômica dos genes envolvidos no metabolismo do PHB em diferentes espécies	34
Figura 9. Diferentes métodos de imobilização de proteínas em suportes sólidos	42
Figura 10. Modelo representativo da interação entre os resíduos de aminoácidos do domínio SBD com a superfície de PHB.....	47
Figura 11. Gel de SDS-PAGE do teste de expressão da proteína sfGFP	68
Figura 12. Gel de SDS-PAGE da purificação de sfGFP testando condições para purificação proteica por <i>salting out</i>	70
Figura 13. SDS-PAGE de frações de todos os estágios da purificação de sfGFP.....	71
Figura 14. Gel de SDS-PAGE do teste de expressão da proteína sfGFP-SBD	73
Figura 15. Gel de SDS-PAGE da purificação de sfGFP-SBD	74
Figura 16. Gel de SDS-PAGE do teste de expressão das proteínas sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA76	
Figura 17. Gel de SDS-PAGE da purificação de sfGFP-sSBD	77
Figura 18. Gel de SDS-PAGE da purificação de sfGFP-sSBDA.....	78
Figura 19. Gel de SDS-PAGE para teste em resina HIC de sfGFP-sSBD.....	80

Figura 20. Gel de SDS-PAGE para teste em resina IEX de sfGFP-sSBD	81
Figura 21. Gel de SDS-PAGE para expressão suplementada de sfGFP-sSBD em E. coli BL21 (DE3) em meio TB.....	82
Figura 22. Caracterização morfológica das NPs de PHB sem proteína (controle).....	84
Figura 23. Análise de MEV-EDS e estabilidade das nanopartículas controle de PHB.....	84
Figura 24. Etapas do teste de saturação das proteínas fluorescentes em nanopartículas de PHB	87
Figura 25. Isotermas de saturação de nanopartícula de PHB pelas diferentes proteínas recombinantes	88
Figura 26. Curva de saturação de sfGFP em nanopartículas de PHB	94
Figura 27. Análise por SDS-PAGE do teste de saturação de nanopartículas utilizando sfGFP..	96
Figura 28. Análise por SDS-PAGE do teste de saturação de nanopartículas utilizando sfGFP-SBD	97
Figura 29. Análise por SDS-PAGE do teste de saturação de nanopartículas utilizando sfGFP-sSBD	97
Figura 30. Análise por SDS-PAGE do teste de saturação de nanopartículas utilizando sfGFP-sSBDA	98
Figura 31. Imagens de MET de nanopartículas funcionalizadas com a proteína sfGFP-SBD em diferentes ampliações.	101
Figura 32. Imagens de MEV das micropartículas de PHB antes e após a funcionalização com sfGFP-SBD e suas variantes	103
Figura 33. Imagens de Microscopia Confocal das micropartículas funcionalizadas	105
Figura 34. Imagens topográficas de AFM das nanopartículas de PHB antes e depois da funcionalização	107
Figura 35. Imagens do espectro de FTIR acoplado à AFM das nanopartículas antes e após funcionalização com proteínas fluorescentes	109
Figura 36. Análise de diâmetro hidrodinâmico e polidispersão por DLS das nanopartículas antes e após a imobilização	111

Figura 37. Análise de diâmetro hidrodinâmico e polidispersão por DLS das proteínas sfGFP-SBD e sfGFP-sSBD em meio tamponado	112
Figura 38. Análise por espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) da proteína sfGFP-SBD em solução.....	117
Figura 39. Análise por SPR das nanopartículas de PHB funcionalizadas pelas proteínas recombinantes	119
Figura 40. Teste de dessorção das diferentes proteínas recombinantes em nanopartículas de PHB a partir de 0,1% de Triton X-100.	122
Figura 41. Perfil de retenção de fluorescência das diferentes proteínas recombinantes após as etapas de dessorção com Triton-X100	123
Figura 42. Previsão estrutural das proteínas recombinantes pelo software RoseTTA Fold.....	126
Figura 43. Domínios SBD C-terminais das variantes sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA modeladas por RoseTTA Fold.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes bacterianas **49**

Tabela 2. Meios de cultivo **49**

Tabela 3. Antibióticos **50**

Tabela 4. Plasmídeos **51**

Tabela 5. Purificação de sfGFP **72**

Tabela 6. Parâmetros de ajuste da isoterma de adsorção de Freundlich **91**

Tabela 7. Porcentagem e rendimento de imobilização das proteínas recombinantes **92**

Tabela 8. Densitometria das bandas das frações não ligadas e imobilizadas das proteínas **99**

Tabela 9. Potencial Zeta das nanopátulas funcionalizadas **114**

LISTA DE ABREVIACOES

AFM - Microscopia de força atômica

Amp - Ampicilina

BSA - Albumina de soro bovino

Cys – cisteína

D.O. - Densidade Ótica

DLS – *Dynamic Light Scattering*

FDL – Fração Desligada

FNL – Frao No Ligada

FL – Frao Lavada

GFP – *Green Fluorescent Protein*

HIC – *Hydrophobic Interaction Chromatography*

IEX – *Ion Exchange Chromatography*

IMAC – *Immobilized Metal Affinity Chromatography*

IPTG - isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Km – Canamicina

MALDI-TOF/MS – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight mass spectrometry*

NPs - Nanopartículas

PCR - Reao em cadeia da polimerase

PHA – Poli-hidroxiacanoatos

PHB – Poli-3-hidroxi butirato

RBD – *Receptor Binding Domain*

RFU – *Relative Fluorescence Units*

r.p.m. – Rotação por minuto

SBD - *Substrate Binding Domain*

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante

SEC – *Size Exclusion Chromatography*

sfGFP – *super folder GFP*

SrtA – Sortase A de *Staphylococcus aureus*

sSBD – *short SBD*

1. INTRODUÇÃO

Nanopartícula (NP) é o termo que se refere a qualquer material particulado que apresente pelo menos uma das suas três dimensões (x, y, z) na escala nanométrica (1 a 100 nm) (KHAN et al., 2021; TOMA, 2016). Nas últimas décadas, o emprego das nanopartículas tem expandido exponencialmente em diferentes áreas da biotecnologia, essencialmente nas áreas alimentícia e farmacológica, de diagnósticos, terapias, nas plataformas de imunização, na engenharia de tecidos e até mesmo na constituição de biossensores, sanitizantes e EPIs (HASANZADEH et al., 2021; KHAN et al., 2021; SMITH et al., 2015). Desde 2001, quando os EUA estabeleceram a Iniciativa Nacional à Nanotecnologia (NNI), até 2022, cerca de US\$ 293,1 bilhões foram destinados à pesquisa e ao mercado biotecnológico mundial envolvendo as nanopartículas; sendo a sua projeção mundial de US\$ 350,8 bilhões até 2025 (ALBALAWI et al., 2022; NAJAH-MISSAOUI et al., 2021).

Na área de constituição de imunizantes, por exemplo, as nanopartículas são utilizadas como veículos de entrega de antígenos e adjuvantes devido ao seu tamanho e às suas características direcionadas a receptores específicos. O seu tamanho nanométrico facilita o reconhecimento e a incorporação pelos macrófagos e pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), além de permitir maior estabilidade e liberação gradual do antígeno (KHEIROLLAHPOUR et al., 2020). Nanopartículas à base de lipídeos e polímeros têm recebido maior destaque nessa área. Isso porque possuem maior capacidade de encapsulação e imobilização das moléculas de interesse, são de fácil manipulação e têm alta biodegradabilidade e biocompatibilidade com o sangue e com os tecidos biológicos (PATEL et al., 2014; JIN et al., 2019; WIBOWO et al., 2021). Diferentes polímeros naturais já foram utilizados para essa finalidade, como quitosana (MURALIDHARAM et al., 2019), alginato (SAREI et al., 2013), ácido hialurônico (VERHEUL et al., 2011), amido (FASQUELLE et al., 2022), polianidridos (HAUGHNEY et al., 2013), polihidroxialcanoatos (PARLANE et al., 2012) e polímeros sintéticos, como o ácido poli-(lático-co-glicólico) (PGLA) (DANKAL et al., 2017).

O poli-3-hidroxibutirato (PHB), um polihidroxialcanoato de origem bacteriana, é um excelente candidato ao carreamento de biomoléculas, uma vez que possui baixo custo de produção, é escalonável, biocompatível, biodegradável e funcionalizável (RAZA; ABID; BANAT, 2018; TEBALDI et al., 2019). Sua síntese e armazenamento intracelular depende diretamente de enzimas e proteínas anfipáticas que recobrem sua superfície e exercem funções essenciais ao seu metabolismo (MATO et al., 2020). Parlane et al. em 2012 e 2014 e Martinez-

Donato et al. em 2016 foram os pioneiros a utilizar grânulos de poli-3-hidroxi-butarato (PHB) como micropartículas carreadoras de antígenos contra tuberculose e hepatite C, respectivamente. Na sequência, em 2017 e 2019, Gonzalez-Miró et al. e Chen et al. também exploraram a capacidade de imobilização das nanoesferas de PHB na confecção de vacinas contra *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. Os altos títulos de IgG1 e IgG2 contra os antígenos PsaA nos resultados de Gonzalez-Miró et al. (2017) foi atribuída a uma proteína de ancoragem ao PHB recombinada geneticamente na porção C-terminal dos seus antígenos. Essa proteína âncora, denominada de PhaC (PHA sintase), é uma das enzimas anfipáticas de recobrimento dos grânulos *in vivo*, responsável pela síntese do polímero em condições apropriadas.

Dessa forma, o uso de proteínas de fusão na formulação de vacinas recombinantes tem permitido que antígenos naturalmente insolúveis com a natureza do carreador possam ser veiculados de forma estável, livres de degradação proteolítica e com maior biodisponibilidade a células apresentadoras de antígenos (APC) (YU et al., 2016). Para vacinas à base de poli-3-hidroxi-butarato, isso é possível desde que a proteína parceira de fusão seja anfipática e contenha domínios hidrofóbicos específicos para a sua imobilização ao PHB. Assim como PhaC, as enzimas PhaZ de *Ralstonia pickettii*, responsáveis pela depolimerização dos grânulos, também são possíveis candidatas a proteínas de fusão, uma vez que possuem um domínio de afinidade ao PHB, denominado SBD (*Substrate Binding Domain*), na sua porção C-terminal. O SBD já foi utilizado em 2005 e 2006, por Park et al., como domínio de ancoragem a antígenos do envelope viral de SARS-CoV-1 em plataformas diagnósticas, utilizando filmes de PHB como suporte de imobilização.

Para que uma vacina seja considerada efetiva, é essencial que as *tags* (proteínas âncoras) não alterem a estrutura nativa do antígeno recombinante, uma vez que dobramentos errôneos podem inviabilizar seu reconhecimento, opsonização e penetração pelos receptores de células-alvo e pelos anticorpos correspondentes (PATI et al., 2018; TREGONING et al., 2020; YU et al., 2016). Existem diferentes fatores que podem interferir na estabilidade estrutural dos antígenos expressos em sistemas heterólogos. Embora as cepas de *E. coli* sejam um ótimo sistema de expressão de antígenos recombinantes em larga escala, a sua maquinaria de processamento pós-traducional só ocorre no seu periplasma, o que frequentemente favorece o aparecimento de pontes dissulfeto indesejadas inter e intra-cadeias das proteínas superexpressas no momento de síntese das mesmas (FRANCIS, 2018; ZHANG; CHOU; MOO-YOUNG, 2011). Além disso, tem sido relatado que o tamanho das *tags* também pode

interferir no dobramento das proteínas recombinantes. Essa situação pode afetar diretamente a eficiência de reconhecimento do epítipo pelos anticorpos (BANKI et al., 2015; HAY et al., 2015).

A tag SBD de PhaZ de *R. pickettii*, por exemplo, consiste em apenas 65 resíduos de aminoácidos, sendo dois deles cisteínas, uma na posição C431 e outra na posição C487. Embora o SBD nunca tenha sido utilizado até o momento na constituição de vacinas, possíveis pontes dissulfeto indesejadas entre as suas duas Cys e da proteína de interesse podem alterar a conformação estrutural do antígeno recombinante e, conseqüentemente, afetar seu potencial de imobilização nas nanopartículas de PHB e seu reconhecimento pelos anticorpos. Assim, a hipótese desse trabalho é que uma variante da tag SBD, denominada *short* SBD (sSBD), contendo uma deleção dos 8 primeiros resíduos de aminoácidos, incluindo a C431, bem como uma subvariante contendo a substituição C487A da tag sSBD, possa aumentar a imobilização da proteína de interesse à nanopartícula.

Para testar essa hipótese, neste projeto, a proteína verde fluorescente (*super folder* GFP ou sfGFP) foi recombinada geneticamente na porção N-terminal às diferentes tags, funcionando como um ensaio piloto para possíveis aplicações futuras envolvendo antígenos recombinantes. Em muitos estudos, as proteínas fluorescentes funcionam como excelentes proteínas repórteres, pois permitem o rastreamento da parceira de fusão em diferentes etapas do delineamento experimental, emitindo luz quantificável em espectrofotômetro ou fluorímetro, sem necessidade de substrato, quando expostas a comprimentos de onda nas faixas UV e azul do espectro visível (RIGGS, 2001), o que facilita a dosagem da proteína recombinante ao final de cada etapa. Adicionalmente, a sfGFP, uma variante da GFP original, possui três pontos de mutação relacionados ao seu *folding*, o que aprimora sua solubilidade e da sua parceira de fusão em estudos de expressão proteínas heterólogas em *E. coli*. Além disso, a sfGFP apresenta 50x mais fluorescência do que a sua versão WT (*wild type*) GFP (PÉDELACQ et al., 2006). Desta forma, foram testadas quatro proteínas de interesse a serem imobilizadas nas nanopartículas, sfGFP-SBD, sfGFP-sSBD, sfGFP-sSBDA e sfGFP, sendo a proteína sfGFP sem cauda o controle negativo desse experimento.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A Organização Mundial da Saúde, no dia 11 de março de 2020, declarou como pandemia a rápida progressão de casos clínicos causados pelo novo coronavírus, o SARS-CoV-2 (LAKE, 2020; WU et al., 2020). Diante dessa crise emergente de saúde pública, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma plataforma nacional de imunização contra o coronavírus, baseada em nanopartículas de PHB como sistemas de entrega de antígeno, demonstrando resultados prévios 53 vezes superiores às respostas imunes dos tratamentos controles (só PHB ou só adjuvante) no estágio pré-clínico. A plataforma em questão utilizou o domínio SBD de PhaZ de *R. pickettii* T1 como *tag* para ancoragem do domínio RBD (*Receptor Binding Domain*) da proteína S do coronavírus às nanopartículas. Entretanto, a sequência primária de RBD apresenta 8 resíduos de Cys, responsáveis pela sua estabilidade estrutural e pelo reconhecimento ao receptor ACEII (Enzima Conversora de Angiotensina II) e por imunoglobulinas (GRISHIN et al., 2022; LAN et al., 2020; WANG et al., 2020).

Dada essa configuração de resíduos de cisteína nos domínios RBD e SBD e à possibilidade de ocorrência de pontes dissulfeto indesejadas no dobramento da proteína RBD-SBD de *E. coli* BL21 (DE3), torna-se interessante investigar se as variantes da *tag* SBD propostas neste projeto, com menores conteúdos de cisteína, podem otimizar a imobilização da proteína RBD-SBD na nanopartícula e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade na entrega do antígeno *in vivo*, futuramente na etapa clínica.

Dessa forma, este projeto é utilizado como piloto para investigar a eficiência de imobilização das novas *tags*. Adicionalmente, abre-se pressuposto que seus resultados podem demonstrar ser uma estratégia promissora para otimizar plataformas de imunização envolvendo as *tags* SBD, que, até o momento, não apresenta nenhuma participação na constituição de vacinas no mercado mundial.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é analisar se a remoção total ou parcial das cisteínas do domínio de ancoragem SBD de PhaZ de *R. pickettii* T1, bem como sua redução de tamanho, podem interferir no grau de imobilização da proteína recombinante nas nanopartículas de PHB e, conseqüentemente, na funcionalização da nanopartícula como futura plataforma de imunização.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto se estendem a:

- Expressar e purificar as proteínas recombinantes contendo o SBD original e suas variantes (sfGFP-SBD, sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA), bem como seu controle negativo (sfGFP);
- Identificar o ponto de saturação na imobilização das proteínas recombinantes nas NPs de PHB;
- Caracterizar morfologicamente as nanopartículas funcionalizadas por técnicas de microscopia;
- Comparar a afinidade e rendimento de imobilização de sfGFP-SBD com a das suas variantes através de isothermas de adsorção, testes de dessorção e análise por SPR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nanopartículas na produção de vacinas

3.1.1 Nanoescala e nanopartículas

As nanopartículas (NPs) são definidas como qualquer material particulado com pelo menos uma das suas três dimensões (x, y, z) na escala nanométrica (1 a 100 nm) (KHAN et al., 2021; TOMA, 2016). As NPs apresentam uma grande diversidade de formas, tamanhos e composições químicas que possibilita sua aplicação em diferentes áreas da biotecnologia, especialmente na área médica. Existem diferentes formas de classificar as NPs. Segundo o tamanho, elas podem ser classificadas como zero, mono, bi ou tridimensionais. Quanto à forma, as NPs podem ser agrupadas em isotrópicas ou anisotrópicas. Entretanto, a forma mais convencional de classificá-las é através da sua composição química. Por esse critério, elas podem ser classificadas como à base de carbono (hidrocarbonetos); inorgânicas, metálicas ou magnéticas; poliméricas e as lipídicas. Cada grupo apresenta propriedades físicas e químicas próprias que permitem ser exploradas tanto na área terapêutica quanto diagnóstica (MADELA, CHAKRABORTY, PRASAD; 2019).

A partir da metade do século XXI, os nanomateriais, em particular as nanopartículas, têm despertado interesse acadêmico e comercial e diferentes pesquisas explorando o potencial das nanopartículas na área médica atingiram níveis crescentes de recursos (MADELA,

CHAKRABORTY, PRASAD; 2019; NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2020). A figura 1 abaixo mostra o modelo de crescimento exponencial de pesquisas na área nanotecnológica, monitorado no início dos anos 2000 até o final de 2019.

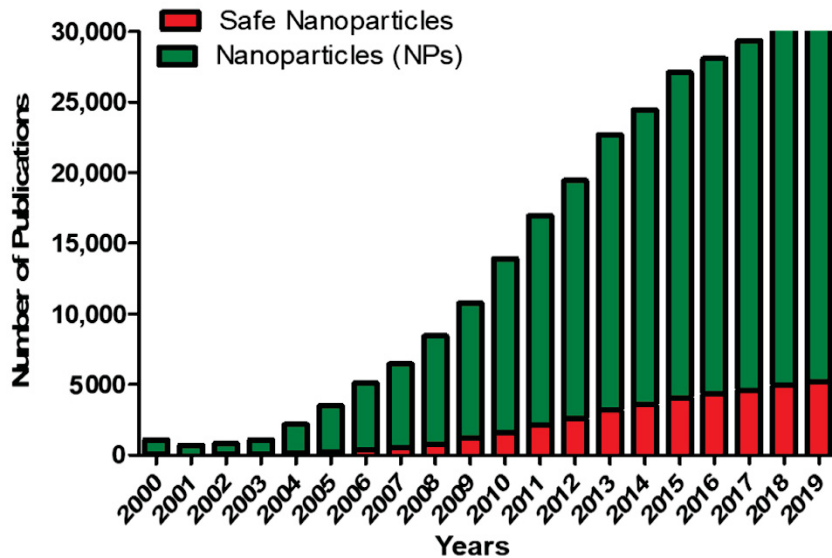


Figura 1. Crescimento exponencial de publicações sobre os potenciais usos do emprego de nanopartículas na biotecnologia nos últimos 20 anos. Utilizando o banco de dados do Pubmed com a palavra “nanoparticles”, pode-se perceber, em verde, o crescimento exponencial de pesquisas publicadas envolvendo nanopartículas nas duas últimas décadas. Em vermelho, também se observa um acompanhamento crescente de pesquisas relacionadas à biossegurança e toxicidade dessas nanopartículas em sistemas biológicos. Fonte: NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2020.

A principal vantagem em se utilizar NPs para fins medicinais ou diagnósticos são as suas propriedades decorrentes da nanoescala (KHAN et al., 2019; 2021; SANDERS, 2019). A nanoescala é definida como a grandeza física que se estende, teoricamente, de 1 nm a 1 µm (figura 2). Entretanto, na faixa específica de 1-100 nm, as propriedades físicas da matéria de um mesmo material são alteradas em relação à micro e macroescala, devido aos efeitos quânticos (AL-HAKKANI, 2020; JOUDEH; LINKE, 2022).

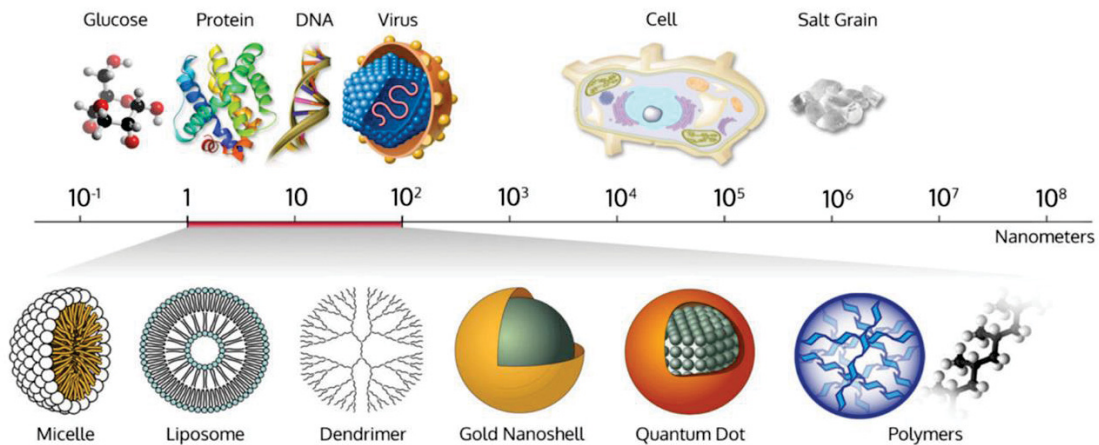


Figura 2. Representação esquemática da nanoescala (1-100 nm). As NPs podem variar de tamanho de 1 a 100 nm. Nessa faixa, denominada nanoescala, também se encontram as macromoléculas biológicas como proteínas e ácidos nucleicos, moléculas simples como aminoácidos e glicose e algumas espécies de vírus. A escala atômica é composta por moléculas menores de 1 nm, onde se encontra moléculas mais simples como H_2O e $NaCl$. Vírus complexos e bactérias encontram-se na faixa micrométrica (> 100 nm). Fonte: Saallah, S; Lenggoro, I. W. (2017).

Na nanoescala, as propriedades mecânicas, ópticas, elétricas, magnéticas e térmicas dos materiais são alterados em decorrência das suas dimensões. Quanto menor o tamanho do material, mais próximo o seu raio se aproxima do raio atômico de Bohr, e assim, maior é o efeito de confinamento quântico desse nanomaterial. Dessa forma, nanopartículas de ouro possuem menor ponto de fusão quando comparadas com partículas na escala macrométrica, bem como platina e paládio, por exemplo, que exibem propriedades magnéticas quando estiverem na nanoescala. O confinamento quântico também pode resultar em mudanças significativas na afinidade eletrônica ou na capacidade de aceitar ou doar elétrons, o que se reflete diretamente nas propriedades elétricas e catalíticas do material (AL-HAKKANI, 2020; JOUDEH; LINKE, 2022). Adicionalmente, a área superficial das NPs é muito maior em relação à área das micro e macropartículas, o que infere que exista maior fração de átomos na sua superfície. Consequentemente, há uma maior exposição de grupos funcionais na superfície desses nanomateriais, com maior reatividade e maior interação com outras biomoléculas, o que possibilita seu uso no carreamento de biomoléculas, por exemplo (HOSEINZADEH et al., 2017).

Nesse sentido, ouro e prata têm apresentado propriedades ópticas e elétricas distintas na nanoescala quando interagem com a luz (KHAN et al., 2021; SANDERS, 2019), o que permite a utilização de AuNPs e AgNPs como agentes de contraste em exames de imagem (KHAN et al., 2019), na constituição de biossensores (ALTINTAS, 2018) e em terapias antineoplásicas e

antimicrobianas (BARBALINARDO et al., 2018; PENG et al., 2019; SOFI et al., 2021). As propriedades magnéticas de nanopartículas de ferro e derivados (FeO , Fe_2O_3 e Fe_3O_4), por sua vez, são voltadas ao diagnóstico rápido contra patógenos (SINGH et al., 2016) e ao tratamento hipertérmico contra câncer (PIEHLER et al., 2020; SILVA et al., 2014; SOETAERT et al., 2020). Zaghary et al. (2021) também exploraram a elasticidade e força tênsil dos nanotubos de carbono na engenharia de tecidos como matrizes para aumentar a retenção e proliferação de células tronco.

3.1.2 Vacinas à base de nanopartículas

Para uma vacina ser considerada efetiva é preciso atender três critérios: ser segura para os seres humanos, ser estável e perene dentro do organismo e serem capazes de induzir resposta imune protetora com um menor número de doses. Vacinas que utilizam subunidades do patógeno, apesar de serem efetivas e de induzirem poucos efeitos adversos, necessitam de um número maior de dosagens porque provocam uma resposta imune branda. Sendo assim, o uso de adjuvantes é frequente nas vacinas de subunidades por melhorarem a imunogenicidade e a apresentação do antígeno vacinal. Por outro lado, os adjuvantes tradicionais à base de materiais inorgânicos também provocam toxicidade ao organismo a longo prazo (WIBOWO et al., 2021).

Os carreadores de antígeno com melhores resultados frequentemente têm sido os vetores virais ou veículos biomiméticos, necessários para entregar os antígenos recombinantes às células apresentadoras de antígenos (APCs). Esses vetores também são úteis por conferirem maior tempo de circulação, mantendo a estabilidade do imunógeno. Um carreador ideal precisa ser adaptado para entregar múltiplos antígenos em paralelo, precisa ser modulado à particularidade de cada antígeno para garantir sua estabilidade durante o transporte e precisa ser facilmente produzido em larga escala. (WIBOWO et al., 2021).

Atualmente esses vetores geralmente são estruturas esféricas na ordem nanométrica. A principal vantagem de utilizar nanopartículas em detrimento das micropartículas na formulação de vacinas é o seu tamanho reduzido, que interfere diretamente no grau de internalização da vacina e processamento do antígeno pelas células APCs. Segundo Mohanraj e Chen (2006), nanopartículas de 100 nm tiveram 2,5 vezes mais importação do que micropartículas de 1 μm e 6 vezes mais que micropartículas de 10 μm quando testadas em macrófagos murinos. Além disso, a área superficial das NP é maior que das micropartículas, possibilitando maior volume de biomoléculas carregadas. Diferentes materiais podem ser

utilizados para confecção de vacinas à base de nanopartículas. NP inorgânicas funcionam tanto como adjuvante como veículo de entrega. Vacinas contra tétano, difteria e influenza do tipo B já foram formuladas com NPs de alumínio em sua composição, devido à forte resposta imune elicitada. NPs de ouro, sílica e fosfato de cálcio também apresentam a vantagem de serem facilmente funcionalizadas, tanto por proteínas séricas *in vivo* (efeito corona) quanto *in vitro* (SMITH; MORTON; ULERY, 2015).

As NPs à base de lipídios ou polímeros naturais são as nanopartículas mais indicadas para se constituir vetores de entrega de antígenos devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Outra classe são as nanopartículas semelhante a vírus (VLNP), as quais mimetizam vírus ao exporem antígenos recombinantes em seus capsídeo ou envelope. A vantagem de usar antígenos imobilizados na superfície - em contraposição a antígenos encapsulados - é que a resposta humoral é acentuada e a resposta imunogênica, em geral, é mais rápida (LOGOTHETIDIS, S. 2012).

Após a pandemia do COVID-19, o investimento em nanomateriais aumentou ainda mais, distribuindo seus usos na confecção de máscaras, na produção de kits diagnósticos, na entrega de medicamentos e na constituição de vacinas, como da Moderna e Pfizer/BioNtech. Em um levantamento feito por Liu e colaboradores (2023), as nanopartículas lipídicas (33%) e poliméricas (10%) conjugadas às biomoléculas revelaram-se os principais nanomateriais utilizados como carreadores de biomoléculas e fármacos terapêuticos no período de 1999 a 2022.

3.1.3 Nanopartículas poliméricas

Os polímeros são definidos como moléculas de alto peso molecular, formadas pela repetição de iguais ou distintas moléculas de menor de peso, denominadas de monômeros. Eles podem ser ramificados ou não e podem ser sintéticos ou naturais. Em geral, no campo biotecnológico, os polímeros podem ser produzidos em tamanhos variados, tanto na micro quanto na nanoescala, cada um apresentando características diferentes, de acordo com o objetivo proposto de sua utilização (ZHUIKOVA et al., 2022).

A utilização das nanopartículas poliméricas no cenário médico é frequentemente relacionada às suas características biodegradáveis e biocompatíveis, à sua fácil manipulação e síntese, ao seu maior potencial de direcionamento por encapsulação, à liberação controlada do

princípio ativo e ao aumento de retenção de biomoléculas nos sistemas biológicos. Uma grande vantagem dessas nanopartículas são os métodos simples de síntese, como emulsificação, nanoprecipitação, nanodíálise, gelificação iônica e microfluídica, o que facilita sua manipulação e controle (MOREIRA et al., 2022).

Dependendo do seu método de síntese, as NPs poliméricas podem variar em tamanho, podendo atingir de 10 a 200 nm de comprimento ou diâmetro e isso interfere muito na sua importação e biodegradação celular. Elas podem ser classificadas também quanto à forma de carrear as biomoléculas e os fármacos (MOHAMMAPDOUR; GHANDEHARI, 2022). As nanocápsulas envolvem o princípio ativo no interior do polímero, enquanto as nanoesferas formam uma matriz sólida de polímero, onde os componentes ativos e fármacos são dispostos em sua superfície por adsorção física ou química/covalente, como demonstrado na Figura 3.

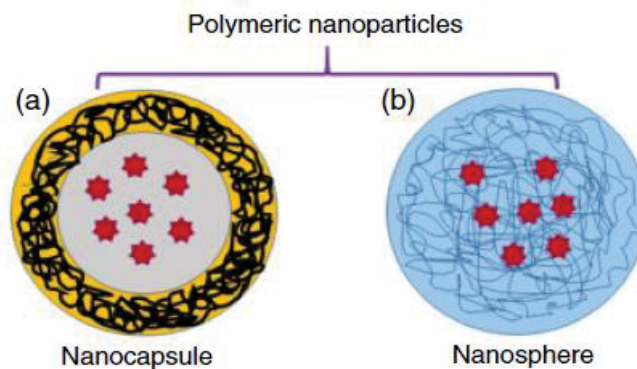


Figura 3. Esquema ilustrativo de carreamento de biomoléculas por nanopartículas poliméricas. Na nanocápsula, os princípios ativos são interiorizados no polímero. Na nanoesfera, eles são aderidos na superfície da matriz porosa, seja por adsorção física ou química/covalente. Fonte: RAI; RAZZAGHI-ABYANEH; INGLE (2020).

As nanocápsulas têm apresentado maior destaque na área de *drug delivery*. O encapsulamento oferece a vantagem de entregar menores doses do fármaco ou proteína ao local específico, reduzindo sua toxicidade e mantendo a integridade estrutural do composto ativo ou proteína durante o trajeto. Adicionalmente, as nanocápsulas melhoram a solubilidade de fármacos e peptídeos hidrofóbicos, aumentam sua biodisponibilidade e tempo de meia-vida, otimizam a absorção nos tecidos-alvo e ainda permitem uma liberação gradual do composto conforme sua taxa de biodegradação pelo organismo (CHAUHAN et al., 2020; CHEN et al., 2006; MOREIRA et al., 2022).

A quitosana é um exemplo de biopolímero modificado, derivado de polímeros naturais. Nanopartículas de quitosana apresentam vantagens de serem mais hidrossolúveis e estáveis no carregamento em detrimento dos polímeros sintéticos, como o polietilenoglicol (PEG), possibilitando maior absorção celular e menor toxicidade. Os grupos aminos carregados da quitosana estabelecem sua ligação ao DNA e às membranas biológicas, favorecendo sua escolha como carreadores de adjuvantes e vacinas (JIN et al., 2019; WIBOWO et al., 2021). Os polímeros catiônicos pABOL e PEI são excelentes carreadores sintéticos de DNA e mRNA devido às suas amins terciárias. Essa propriedade funciona como esponjas, as quais encapsulam facilmente ácidos nucleicos por interações eletrostáticas, permitindo seu uso nas plataformas de terapia gênica e imunização à base de ácidos nucleicos (LIN et al., 2007). Nanopartículas lipossômicas de múltiplas camadas complexadas a ácido polilático (PLA), por exemplo, têm sido planejadas para liberar controlada e gradualmente uma combinação de múltiplos antivirais redirecionados ao tratamento do COVID-19 (CHAUHAN et al., 2020).

Por outro lado, a fácil funcionalização da superfície dos polímeros favorece o uso deles em nanoesferas como sistemas de entrega de vacinas (JAIN et al., 2010; LEE et al., 2015; ROGERS et al., 2013). Nanoesferas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e de poli(estireno) (PS) foram usadas como sistema de transportes de antígenos do vírus da dengue (DV2EP) e da influenza A (H1N1), respectivamente, ambas gerando alta titulação de anticorpos IgG (LEE et al., 2018; ZHANG et al., 2017). Nanopartículas de poli (ácido lático -co- glicólico) (PGLA) também já foram usadas em 2018 para carrear antígenos de superfície de *Plasmodium vivax*, hepatite B e de *Bacillus anthracis*, funcionando também como adjuvantes naturais (ANZAGHE et al., 2018). Nanotubos de carbono complexados a polímeros sintéticos foram imobilizados por ácidos nucleicos, resgatando seu potencial como agente de transporte na terapia gênica e em vacinas de DNA e mRNA (LACERDA et al., 2006; PANTAROTTO et al., 2003; SZLEIFER; YERUSHALMI-ROZEN, 2005). No estudo de Ahmad e Sardar (2015), a imobilização em nanoesferas também aumenta sua eficiência de catálise e reduz sua susceptibilidade à degradação.

3.2 Nanopartículas de poli-3-hidroxi-butirato (PHB)

3.2.1 Polihidroxi-alcanoatos

Os microrganismos podem sintetizar e armazenar diferentes classes de polímeros dependendo da espécie e da composição dos seus substratos (monômeros). Segundo Potter e Steinbuchel (2005), as principais classes de biopolímeros microbianos são I) ácidos nucleicos (DNA e RNA e complexos ácidos nucleicos-proteínas), II) poliamidas (proteínas e cianoficinas), III) polissacarídeos (celulose, amido), IV) poli-tioésteres (poli(3-mercaptopropionato)), V) polianidridos (polifosfatos), VI) poli-isoprenoides (látex), VII) polifenóis (ligninas) e VIII) poliésteres (poli-hidroxicanoatos). Cada classe apresenta características físico-químicas próprias e apresenta diferentes potenciais biotecnológicos. A identidade, bem como as propriedades químicas de cada polímero, é derivada do(s) monômero(s) que os constituem. Cada monômero de cada polímero apresenta uma frequência de repetição própria, que pode ser determinada ou indeterminada, dependendo da regulação gênica das enzimas de sua síntese (PARRY; BAKER, 1984; REHM, 2010).

Enquanto polímeros informacionais como ácidos nucleicos e proteínas exercem funções centrais no metabolismo das espécies, alguns polímeros menos estudados podem apresentar funções metabólicas secundárias, como material de reserva, esporulação ou defesa, mas com amplo potencial biotecnológico, como os poliésteres. Os poliésteres são polímeros formados pela condensação de dois diácidos, dois diésteres, dois glicóis/dióis, dois hidroxiácidos ou ainda pela condensação intercambial entre esses monômeros, formando um éster central que se repete ao longo da estrutura do polímero. A estrutura dos poliésteres é semelhante à dos plásticos (poliésteres sintéticos), cujas propriedades físicas de plasticidade, leveza, flexibilidade, durabilidade e matéria-prima barata são compartilhadas. Entretanto, por serem sintetizados por sistemas biológicos, os PHA são biodegradáveis e apresentam menos resíduos por etapa de decomposição. Nesse sentido, os poliésteres naturais derivados de microrganismos têm sido extensivamente estudados para seu descobrimento e para sua utilização biotecnológica, como PGA (poliglicolato), PLA (polilactato), PCL (policaprolactona) e PHA (polihidroxicanoatos) (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998; CHANDRA; RUSTGI, 1998; LUENGO et al., 2003; SHAH et al., 2008; VAN DE VELDE; KIEKENS, 2002).

Os polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres biológicos compostos por unidades repetidas de um mesmo ou diferentes ácidos R-hidroxicanoicos (ou R-hidroxicanoatos). Os R-hidroxicanoatos são moléculas de baixo peso molecular constituídas por um grupo hidroxila terminal, uma carbonila terminal e um grupamento alquil funcional R, sendo R a cadeia lateral composta por 1 a 14 átomos de carbono, conforme indica a figura 4. Esses

monômeros são polimerizados por ligações do tipo éster, envolvendo o grupo carboxila com uma hidroxila do monômero adjacente e a consequente liberação da Coenzima A (CoA-SH) (STUBBE et al., 2005; BYROM et al., 1994). Os PHA são exclusivamente alifáticos, ou seja, não apresentam ramificação, e podem atingir um peso molecular de 50.000 a 100.000 Da, dependendo da quantidade de monômeros envolvidos, que, em média, varia de 100 a 30.000 unidades.

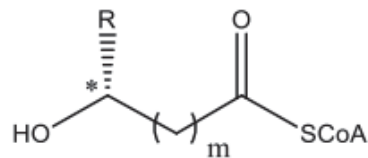


Figura 4. Estrutura geral de um R-hidroxiacil-CoA (monômero). O grupamento acil R representa a cadeia lateral composta de 1 a 14 átomos de carbono, dependendo da identidade do R-hidroxiacilacanoato. A letra m representa o número de carbonos presentes na cadeia principal do monômero. O asterisco representa o carbono quiral. Fonte: adaptado de Stubbe et al. (2005).

Além disso, os PHA são divididos em três grupos. Essa classificação é dependente da quantidade de átomos de carbono que compõem o grupo R de cada monômero, sendo PHA de cadeia lateral curta (*short chain length* ou PHA_{SCL}) com 3 a 5 átomos de carbono; PHA de cadeia lateral média (*medium chain length* ou PHA_{MCL}) com 6 a 14 átomos de carbono e PHA de cadeia longa (*long chain length* ou PHA_{LCL}) com mais de 15 átomos (ANJUM et al., 2016). De modo geral, a estrutura de um polihidroxiacilacanoato não muda entre suas três classificações. Essa estrutura, bem como seus possíveis monômeros, é ilustrada na Figura 5.

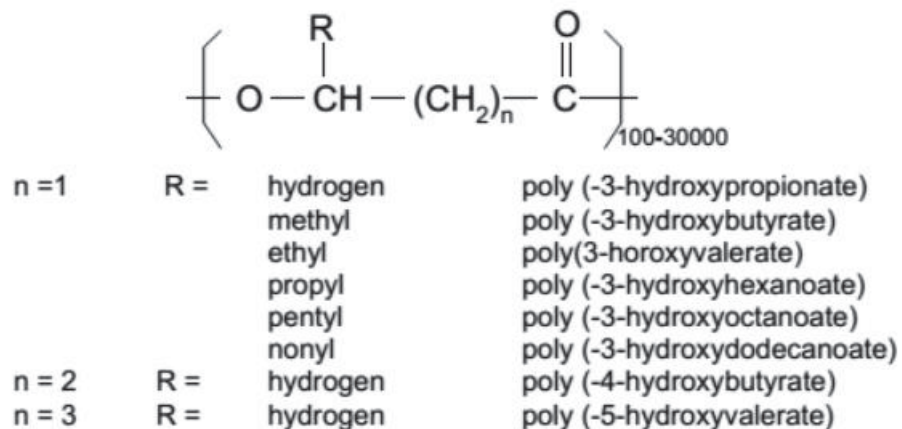


Figura 5. Estrutura geral de um polihidroxialcanoato. A identidade de cada PHA (lista à direita) é variada, pois depende do grupo R que o constitui (à esquerda), bem como o número de átomos de carbono que compõem a cadeia principal do polímero, representada pela letra “n” nesta ilustração. Vale ressaltar que em poli-3-hidroxi-*n*-butirato, o PHA mais sintetizado e estudado em bactérias, o grupo R é um grupo metil e seu monômero possui apenas 3 carbonos na cadeia principal. Fonte: MARVI et al. (2013).

Os PHA de origem microbiana são sintetizados tanto por determinadas espécies de bactérias Gram-positivas quanto por determinadas espécies de Gram-negativas em condições de estresse ambiental e falta de nutrientes, como fósforo, nitrogênio e oxigênio (STEINBÜCHEL, 1998; ANDERSON; DAWES, 1990). Em compensação, diversas fontes de carbono podem ser utilizadas para sintetizar os diferentes tipos de PHA, como glicose, alcanos e alcenos. Em geral, a glicose e derivados são processados pelo microrganismo através da via glicolítica para geração de acetil-CoA e PHA_{SCL}, enquanto alcanos, alcenos e ácidos graxos intermediários são catabolizados pela via β-oxidativa para geração de PHA_{LCL} e PHA_{MCL} (MADISON; HUISMAN, 1999). A presença de uma fonte de carbono específica disponível também afeta diretamente na constituição de qual polímero de PHA será sintetizado. Por exemplo, o PHB (poli-3-hidroxi-*n*-butirato), PHA mais amplamente produzido pelas bactérias, pode ser sintetizado por uma ampla gama de fontes de carbono disponíveis no meio, como malato, glicose, xilose e frutose (SACOMBOIO et al., 2017).

No citoplasma, esses polímeros são armazenados na forma de grânulos, servindo basicamente como fonte de carbono e energia e são depolimerizados na indisponibilidade de carbono no meio para conversão em acetil-CoA e para regeneração de NADPH. Em determinadas espécies e dependendo do tipo de polímero, esses grânulos podem também desempenhar funções extras, além das energéticas, como proteção contra choque térmico e osmótico, irradiação por UV e exposição a agentes oxidantes (KADOURI et al., 2003).

No âmbito biotecnológico os PHA têm sido recentemente mais explorados na área agroindustrial, eletrônica e medicinal justamente por suas características termoplásticas descritas anteriormente e pela vantagem de serem biodegradáveis. A quantidade de átomos de carbono presente nas cadeias laterais, bem como a fonte de carbono fornecida para a síntese do PHA, influencia diretamente nas propriedades físicas do polímero a ser utilizado na biotecnologia. Por exemplo, os PHA_{SCL} são mais cristalinos e apresentam propriedades físicas mais semelhantes aos plásticos sintéticos, como maior durabilidade, maior ponto de fusão e maior rigidez, enquanto os PHA_{MCL} são mais amorfos e possuem menos rigidez e maior propriedade elastomérica e adesiva (SAMROT et al., 2021).

3.2.2 Poli-3-hidroxi-butirato (PHB)

O poli-3-hidroxi-butirato (PHB) é o principal representante da classe dos polihidroxi-alcanoatos e é o mais abundante produzido pelas bactérias. Ele foi o primeiro PHA a ser descoberto, em 1926, por Lemoigne, através de um lisado da bactéria *Bacillus megaterium*. Desde então, o PHB continuou sendo o PHA mais bem elucidado e utilizado na área biotecnológica, principalmente o PHB produzido pela espécie bacteriana *Ralstonia eutropha* H16, que é a estirpe modelo para estudos com o PHB.

A estrutura do PHB é semelhante à estrutura geral dos PHA, como apresentado na figura 5 anteriormente. A principal diferença consiste no único monômero necessário para sua constituição, que é o 3-hidroxi-butirato, uma vez que o PHB é considerado um homopolímero de cadeia curta. Essa molécula apresenta apenas 3 carbonos na cadeia principal e seu grupo R é composto por apenas um radical metila (-CH₃). O polímero é sintetizado a partir da condensação de um grupo hidroxila com a carbonila do 3-hidroxi-butirato adjacente, formando uma estrutura em éster unificando os monômeros que se repete ao longo da cadeia, a qual pode variar de 100 a 30.000 unidades (STEINBÜCHEL, 1991).

Embora a espécie *R. eutropha* H16 seja o microrganismo modelo para estudos de PHB, diferentes espécies de diferentes gêneros também podem sintetizá-lo, por exemplo, bactérias do gênero *Paucimonas* sp., *Herbaspirillum* sp. e *Pseudomonas* sp, em condições específicas de restrição de macronutrientes, como nitrogênio e fósforo. Assim como para síntese dos PHA, é essencial a presença de uma fonte rica de carbono no ambiente e de genes responsáveis para expressão de enzimas e proteínas que regulem seu metabolismo. Entretanto, diferente dos outros exemplos de PHA, o PHB pode ser sintetizado a partir de diferentes fontes de carbono (ALVES et al., 2016). Seus grânulos citoplasmáticos destinados à reserva energética podem chegar a ocupar 90% do peso seco das células, dependendo da espécie e do suprimento energético (PAPAGEORGIOU et al., 2008; SHEN et al., 2019; WAKADKAR et al., 2010). O tamanho desses grânulos amorfos também pode variar de 100 nm a 0,5 µm de acordo com a matéria-prima e da espécie (SHEN et al., 2019; STUBBE; TIAN, 2003), podendo ser visualizados por microscopia eletrônica, como demonstrado na Figura 6.

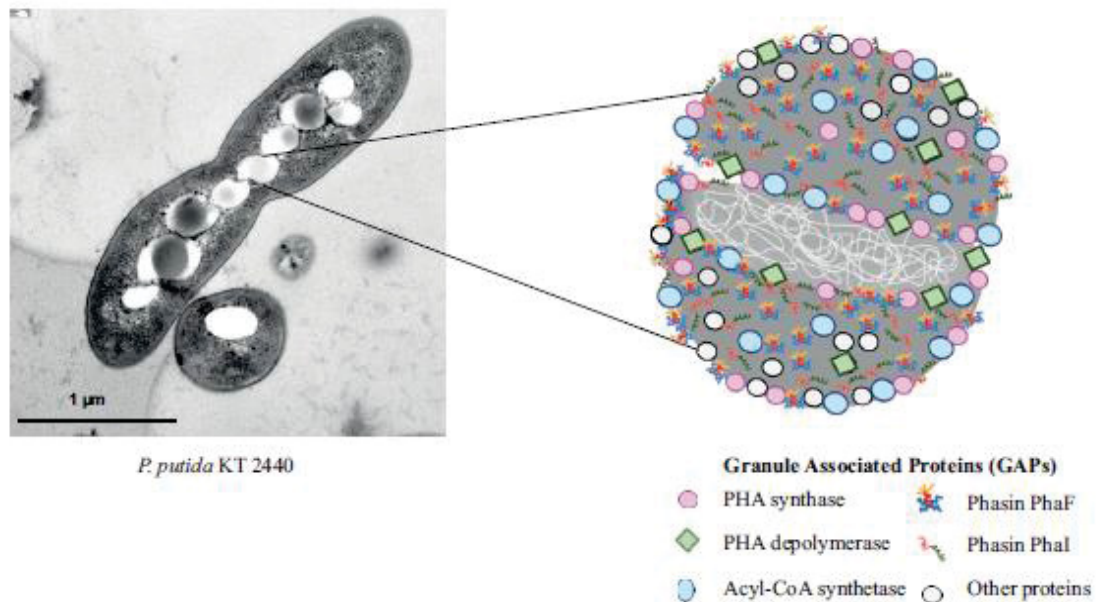


Figura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de grânulos de PHB estocados no citoplasma da estirpe KT2440 de *Pseudomonas putida*. À direita, é ilustrada uma representação esquemática do grânulo revestido por uma camada de fosfolipídeos e proteínas que regulam e participam do seu metabolismo. Fonte: Mato-Blanco et al. (2020).

Como ocorre em PHAs, esses grânulos hidrofóbicos de PHB também são revestidos por fosfolipídeos (0,5%) e por proteínas anfipáticas (2%), as quais exercem papéis essenciais em seu metabolismo, como a classe das fasinases, das sintases e das depolimerases, além de proteínas regulatórias. Essas classes de proteínas são denominadas de GAPs (*Granule Associated Proteins*) (GRIEBEL et al., 1968). A classe de GAP mais abundante na superfície dos grânulos são as fasinases, as quais exercem distintas funções sobre a arquitetura, manutenção e crescimento desses grânulos (DINJASKI; PRIETO, 2013). As fasinases PhaF e PhaP1, por exemplo, controlam o número e tamanho dos grânulos, impedem sua coalescência e suas ligações a proteínas solúveis não específicas, mantêm o volume citoplasmático e induzem a produção do próprio polímero em momentos necessários de reserva (MATO et al., 2020; NEUMANN et al., 2008; POTTER et al., 2002; ZHAO et al. 2016).

3.2.3 Biossíntese e degradação de poli-3-hidroxi-butirato (PHB)

Devido ao extenso potencial de aplicabilidade biotecnológica que esse polímero apresenta, principalmente em substituição aos plásticos de origem petroquímica, é

indispensável o estudo da sua via metabólica e das condições necessárias para sua produção e manipulação em larga escala. A via de síntese do poli-3-hidroxi-butirato em bactérias, em condições ótimas de disponibilidade de carbono, é ilustrada na Figura 7.

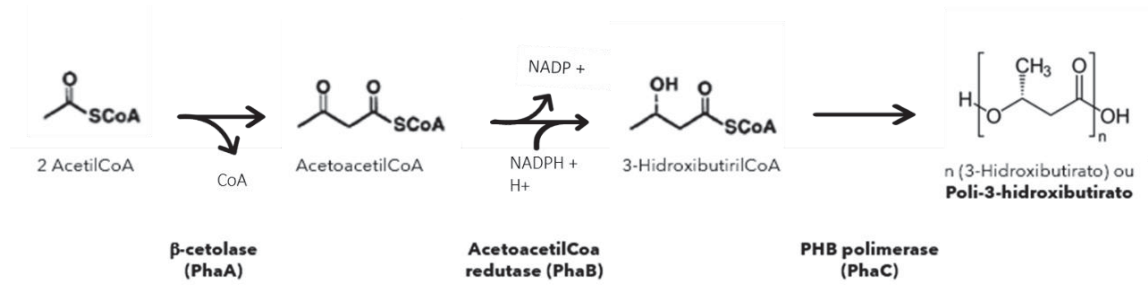


Figura 7. Via biossintética de PHB em bactérias. A rota sintética do polímero em bactérias envolve apenas 3 reações e 3 enzimas principais, além do consumo da coenzima NADPH. Os precursores são sempre intermediários metabólicos clássicos, como duas moléculas de acetil-CoA. Estes precursores são convertidos, em duas etapas, em 3-hidroxi-butirato, que é o monômero necessário para a polimerização do grânulo de PHB. Fonte: Adaptado de MADISON; HUISMAN (1999).

Em *R. eutropha* H16, o metabolismo do PHB foi bem elucidado e acredita-se que pequenas variações entre as espécies possam existir. De modo geral, a matéria-prima rica em carbono fornecida pelo meio ambiente é degradada pelas vias glicolítica ou β -oxidativa, gerando um *pool* citoplasmático de moléculas de acetil-CoA. Duas moléculas de acetil-CoA são então condensadas pela enzima PhaA ou β -cetotiolase (*phaA*), permitindo a formação da molécula acetoacetil-CoA e a liberação de uma coenzima A reduzida. Esta enzima pertence à classe das tiolases, que frequentemente está envolvida também nas rotas biossintéticas de corpos cetônicos, esteroides e isoprenóides (MADISON; HUISMAN, 1999). Alguns estudos apontam que alguns intermediários metabólicos derivados do acetil-CoA, como acil-CoA e malonil-CoA também podem servir como precursores para síntese de PHB e PHA_{MCL}, envolvendo as enzimas PhaJ (enoil-CoA hidratase) e PhaG (3-hidroxiacil-ACP-CoA transferase), respectivamente (REHM; STEINBUCHER, 1999; SAMROT et al. 2021; TORTAJADA; SILVA, PRIETO et al., 2013; WANG et al., 2012). O acetoacetil-CoA é então reduzido, na presença de uma molécula de NADPH, a 3-hidroxi-butiril-CoA (3HB) pela desidrogenase PhaB ou acetoacetil-CoA redutase (*phaB*), liberando também uma molécula de NADP^+ oxidada ao final da reação. Por fim, o 3-hidroxi-butiril-CoA é condensado a outro 3HB adjacente por uma ligação éster para constituição do polímero, através da enzima PhaC ou PHB sintase (*phaC*) (MADISON; HUISMAN, 1999).

A degradação do polímero, por sua vez, ocorre exclusivamente pela enzima PhaZ ou PHB depolimerase (*phaZ*). Essa enzima pertence à classe das hidrolases, com resíduos conservados de Ser-His-Asp no sítio ativo, que acessam o substrato através das ligações carboxílicas e realizam a clivagem do polímero e a consequente liberação de moléculas de 3-hidroxi-butirato intra ou extracelularmente (UCHINO et al. 2008; SAEGUSA et al., 2001). As particularidades dessa classe de enzimas serão mais bem detalhadas na secção 3.4.3 desta revisão. Assim que os 3HB são liberados depois da ação das PHB depolimerases, esses monômeros são destinados à produção de energia pela célula quando as condições ambientais de carbono se tornam escassas. A partir desse momento, o 3HB pode ser convertido em um derivado da coenzima A, como ocorre com o 3HB-CoA (3-hidroxi-butiril-CoA) através de uma tioesterase, ou pode ser diretamente reduzido a acetoacetato pela enzima 3-hidroxi-butiril desidrogenase (ANEJA et al., 2005; RUTH et al., 2008; SANDOVAL et al., 2005; ZHUANG et al., 2008). Como a reação realizada pela enzima PhaA é reversível, a β -cetotiolase converte o acetoacetato em duas moléculas de acetil-CoA, as quais serão utilizadas para alimentar a via catabólica do ciclo do ácido cítrico ou no ciclo do Glioxilato (CAI et al., 2000).

A organização dos genes que participam do metabolismo do PHB nas bactérias é variada no genoma e pode ou não formar operons. Em *R. eutropha* e em *P. oleovorans*, por exemplo, os genes são organizados em operons *phb*, enquanto na maioria das outras espécies, essas organizações dificilmente ocorrem, apresentando expressão independente, conforme necessidade ambiental ou ainda podem formar operons *phb* incompletos ou interrompidos, como mostra a Figura 8 (MADISON; HUISMAN, 1999).

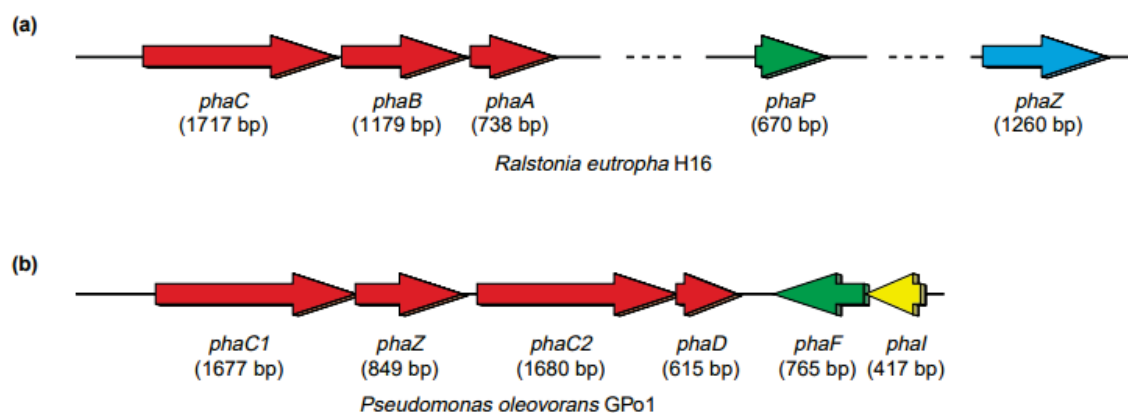


Figura 8. Organização genômica dos genes envolvidos no metabolismo do PHB em diferentes espécies. Em *R. eutropha* H16 (A) os genes *phaC*, *phaB* e *phaA* formam um operon *phb* (*phaCBA*), os quais são destinados à síntese do polímero. Já em *P. oleovorans* GPo1 (B), genes de regulação (*phaD*) e de degradação (*phaZ*) estão organizados em um operon contendo genes relacionados à síntese do polímero (*phaC1* e *phaC2*). Fonte: LUENGO et al. (2003).

Um sistema complexo relacionado a atividades regulatórias do metabolismo de PHB já foram descritas em diferentes espécies, principalmente pelo fato de que tanto PhaC quanto PhaZ estarem presentes aderidos na superfície dos grânulos; isso permite supor que sem um sistema integrado de regulação, os processos de síntese e degradação seriam diretamente proporcionais. Pelo menos 2 sistemas de regulação transcricional foram descritos na maioria das espécies de microrganismos produtores de PHB (KADDOR; STEINBÜCHEL, 2011).

A proteína PhaR, expressa pelo gene *phaR*, é o repressor transcricional mais elucidado em bactérias do gênero *Ralstonia* sp. e *Pseudomonas* sp. Essa proteína de 22 kDa possui dois domínios funcionais, o domínio C-terminal possui a capacidade de se ligar ao DNA, especificamente a regiões promotoras -35/-10 dos genes *phaP* e do próprio gene *phaR*, neste caso, funcionando como um gene autorregulador. O domínio N-terminal possui maior capacidade de ligação ao PHB (MAEHARA et al., 2002; YAMADA et al., 2007). A regulação da quantidade do PHB pelo gene *phaP*, gene que codifica para expressão da fasina PhaP1, já foi demonstrada *in vitro* e *in vivo*, através de mutações no gene *phaR* (Δ *phaR*) de *R. eutropha*, que mostraram aumento na expressão constitutiva de *phaP* e aumento da quantidade de PHA intracelular (MAEHARA et al., 1999; 2001). Segundo Pötter e Steinbuchel (2005), quando níveis citosólicos de acetil-CoA e 3HB-CoA não estão disponíveis, a transcrição do gene de *phaP* torna-se bloqueada pela presença de altos níveis expressos de PhaR autorregulados e ligados ao promotor de *phaP*. Entretanto, quando as condições de biossíntese melhoram, boa parte das moléculas de PhaR expressas se ligam aos grânulos e desbloqueiam o promotor, permitindo a transcrição de *phaP*. Assim, quando os grânulos atingem níveis elevados de tamanho intracelular, as PhaP competem com as PhaR da superfície do grânulo, possibilitando que PhaR se dissocie do PHB e bloqueie novamente a transcrição de *phaP*.

Outro sistema de regulação transcricional negativa dos grânulos de PHB em *Pseudomonas* spp. depende da proteína PhaF. Neste sistema, os genes *phaF* e *phaI*, a qual codifica para proteína PhaI, análoga à PhaP, encontram-se em um mesmo *locus*, enquanto o operon *phaC1ZC2D* encontra-se em outro. A PhaF possui a capacidade de regular negativamente a transcrição tanto de *phaI* quanto do operon de *phaC1*, em um mecanismo semelhante ao que PhaR faz quando existe disponibilidade de fonte de carbono e moléculas precursoras do polímero (PRIETO et al., 1999).

A regulação de genes envolvidos com a degradação do polímero (*phaZ*) está intimamente relacionada ao gene *epdR*. Em *R. pickettii* T1, esse gene codifica para um regulador transcricional da família TetR, denominado *EpdR*, o qual é o principal responsável por se ligar à região operadora do gene que codifica *PhaZ* quando pouca fonte de 3HB ou PHB está disponível, a fim de garantir que o suprimento limitado não seja consumido pela PHB depolimerase, funcionando como regulador negativo de *phaZ*. Entretanto, quando a fonte de carbono é abundante, alguns de seus metabólitos, preferencialmente 3HB, funcionam como regulador positivo para *phaZ*, se ligando à região operadora de *epdR*, bloqueando sua transcrição e impedindo que *phaZ* seja regulado negativamente (SHIRAKI; OKURA; SAITO, 2014).

3.2.4 Aplicações biotecnológicas do poli-3-hidroxibutirato (PHB)

Como descrito anteriormente, o PHB, e PHAs em geral, apresentam diferentes vantagens na esfera comercial devido às suas propriedades termoplásticas e biodegradáveis. O PHB é o único poliéster sintetizado 100% por microrganismos. Todos os outros poliésteres necessitam de processos químicos para sua polimerização, gerando resíduos (RAZA et al., 2018). Por esse motivo, diferentes estratégias de engenharia metabólica podem ser utilizadas como um diferencial para eliminar etapas onerosas de purificação dos grânulos de PHB durante os processos *downstream*. O uso de espécies alternativas também pode ser utilizado para produzir o polímero a níveis escalonáveis e industriais. Por exemplo, o uso de espécies termófilas, como bactérias do gênero *Cupriavidus* sp. e a espécie *Bacillus shackletonii* K5 (LIU et al, 2014; ZHENG et al., 2020), e halófilas, como *Halomonas* sp. e *Natrinema* sp. (TAN et al, 2011; ZHENG et al., 2020), têm apresentado vantagens econômicas para a produção de PHB, gerando cerca de 60 a 75% do seu peso seco em PHB, mesmo em condições extremas de fermentação como 45-50° C e 200 g/L de NaCl , respectivamente.

Além disso, desde a década de 2000, a demanda por produtos biodegradáveis em escala industrial como alternativas aos plásticos tem ganhado força em diferentes cenários mundiais, chegando a uma produção 100.000 toneladas de bioplásticos por ano em 2010 (REHM, 2010). O resultado da quebra do PHB depositado no ambiente é apenas CO₂ e água. Ademais, diversas matérias-primas baratas podem ser utilizadas como fonte de carbono para a produção do PHB, como xilose, glicose, malato, glicerol, citrato, acetato, óleo de milho entre outros compostos orgânicos (ALTHURI et al., 2013; SAMROT et al., 2021). Segundo Raza e

colaboradores (2018), *P. putida* KCTC2407 pode produzir 50% do seu peso seco em grânulos de PHB na presença de 36 fontes de carbono diferentes, o que é uma alternativa essencial para reduzir custos do processo produtivo industrial. Produtos residuais não convencionais, como CO₂, estireno, celobiose, derivados de lignina, gordura residual animal entre outros, também podem ser implementados no meio de cultivo como fonte de carbono para o crescimento de espécies engenheiradas para produzir PHB, como *E. coli* e *Lactobacillus* sp. recombinantes, algumas espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (YLINEN; RUIJTER; PENTILA, 2022) e microalgas do gênero *Chlorella* sp. (KUMARI; KIRAN; MOHAN, 2022).

Assim como a maioria dos PHA_{SCL}, o PHB é extremamente cristalino, o que lhe confere alta rigidez e estabilidade estrutural. Conseqüentemente, ele apresenta uma temperatura de fusão em torno de 176° C (REHM, 2010). Devido a essa característica termoplástica, o PHB é um ótimo candidato para substituir polímeros sintéticos de origem petroquímica para diferentes finalidades, sem alterar suas propriedades ou se degradar frente a pequenas variações de temperatura a qual sejam submetidas. Têm se destacado também os heteropolímeros de PHB, como o PHBV e P(3HB-co-4HB), onde monômeros de 3-hidroxibutirato, 4-hidroxibutirato e 3-hidroxivalerato são usados para sintetizar o polímero, que apresenta o dobro de estabilidade e as mesmas vantagens biocompatíveis e biodegradáveis (ZHENG et al., 2020).

O tamanho do PHB também é outro fator que pode ser modulado para atingir os requisitos necessários de suas aplicações biotecnológicas. *In vivo*, o PHB intracelular atinge tamanhos que variam de 500 nm a 0,5 µm (SHEN et al., 2019). Entretanto, como descrito no item 3.1.1 anterior, a vantagem de utilizar nanopartículas é justamente atribuída à sua maior área superficial. Existem vários métodos sintéticos de produção de nanopartículas. Para o PHB, o método de síntese por nanodálise, investigado por Errico et al. (2009), procurou avaliar a eficiência de entrega de ácido retinóico através da preparação de micro e nanocápsulas de PHB e PGLA contra os métodos tradicionais de síntese, como evaporação de solventes. Neste estudo, ficou evidente que o método de diálise para produção de nanopartículas, para ambos os polímeros, se mostrou eficaz na entrega de biomoléculas. No estudo de Shakeri et al. (2014), o carvacrol encapsulado em nanocápsulas de PHB também tiveram uma vantagem de 11% de eficiência de entrega em relação ao carvacrol administrado na ausência de NP e um tempo de retenção de 3 dias.

Quanto à biocompatibilidade do PHB, diversos estudos de citotoxicidade do polímero em células animais têm apresentado critérios de biossegurança. Nos estudos *in vitro* de Chen et

al. 2007, o PHB apresentou ótimos resultados de biodegradabilidade na presença de esterase intracelular. Segundo Ansari et al. (2021), lipases e enzimas hidrolíticas presentes em alguns tecidos e no sangue são amplamente capazes de degradar as nanopartículas de PHB e Babos et al. (2020) corrobora ainda a participação da fagocitose por macrófagos e neutrófilos na degradação do polímero *in vivo*. Seus resíduos (3-hidroxibutirato) são um componente comum do sangue humano e, a longo prazo, não apresentam citotoxicidade em fibroblastos de modelos murinos testados (BABOS et al. 2020). Além disso, nos ensaios *in vitro* de hemólise e adesão celular envolvendo as NP-PHB no meio de cultura, mesmo em concentrações próximas a 120 µg/mL, as NP não afetaram o desenvolvimento celular das duas linhagens testadas.

Quanto à imunogenicidade do PHB, nos estudos de Parlane et al. (2012), micropartículas de PHB funcionalizadas por antígenos de tuberculose foram inoculadas em camundongos C57BL/6. Os resultados dos seus grupos controle (imunizados apenas com micropartículas de PHB, na ausência do antígeno) permitiram identificar, através da mensuração de citocinas inflamatórias, a eliciação predominante de resposta imune mediada por células, principalmente a resposta celular Th1. Os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-2, IL-10 e TNF- α relatados foram significativos (de 0 a 15 µg/mL) para MP-PHB nativos, com pouca diferença significativa na quantidade particular de cada citocina inflamatória. Entretanto, segundo o estudo de Chen et al. (2019), baixos títulos de IgG1 e IgG2 anti-PhaC nos ensaios de ELISA foram observados a partir do soro coletado de camundongos imunizados apenas com MP-PHB, indicando que o PHB sozinho não é suficientemente capaz de elicitar uma resposta humoral elaborada. Vene e colaboradores (2016) também relatou baixo potencial de opsonização de nanopartículas de hétero e homopolímeros de PHB na presença de soro humano *in vitro*, sendo detectadas apenas pequenas quantidades de albumina, transferrina, fibrinogênio, algumas imunoglobulinas e proteína C3 do sistema complemento aderidos ao PHB. Por esse motivo, o PHB pode funcionar como excelente adjuvante em vacinas de subunidades contra microrganismos patogênicos, justamente devido ao seu background de respostas imunes celulares, produzidas por citocinas inflamatórias em camundongos, responsáveis por intermediar a participação de macrófagos primários, neutrófilos e linfócitos T na resposta imune (MOHAMED et al. 2021).

Devido a suas propriedades apresentadas e a essas vantagens no processo de síntese e purificação, utilizando processos e matéria-prima baratos, o PHB tem sido extensivamente aproveitado na biotecnologia (VIEYRA et al., 2018). Na agricultura, o PHB pode ser

empregado como sacos de cultivo, sacolas de fertilizantes e filmes de compostagem (SHAMSUDDIN et al., 2017). Na área de alimentos e cuidados pessoais, esse polímero apresenta vantagens sustentáveis ao ser utilizado como embalagens de alimentos; substituição a recipientes plásticos; adesivos, fibras, filmes e cápsulas conservantes de nutrientes (BASUMATARY et al., 2020; GAN et al., 2023; GUILLARD et al., 2018; MONTAZER; HARIFI, 2017). Na área industrial, nanopartículas de poli-3-hidroxibutirato também podem servir como suportes físicos para imobilização de enzimas, principalmente lipases, que possuem baixa taxa de reuso (SAMROT et al., 2021).

Na área médica, as propriedades térmicas, elastoméricas e tênsil têm favorecido sua utilização como biomateriais como *scaffolds* e hidrogéis na engenharia de tecidos, pinos cirúrgicos, suturas, substituição de ossos, cartilagens e vasos sanguíneos (HONG et al., 2009; ORYAN, et al. 2014, RAZA et al., 2018), uma vez que estes biomateriais também apresentam excelente biocompatibilidade com vários tipos de células, como condrócitos, fibroblastos, osteócitos, queratinócitos e células-tronco. Em 2003, o uso de matrizes porosas e filmes de PHBV para proliferação *in vitro* de células humanas, como fibroblastos, hepatócitos e células endoteliais, já havia sido explorada por Sevastianov e colaboradores, desvendando seu uso na engenharia de tecidos nos anos posteriores. No estudo de Xu e colaboradores (2010), por exemplo, as células tronco neurais aderiram e colonizaram melhor nas nanofibras de PHBV do que na matriz extracelular natural. Adicionalmente, o uso de implantes à base de PHB em procedimentos pós cirúrgicos em gatos e coelhos também obtiveram resultados positivos na recuperação dos tecidos (ALVES et al., 2011; REIS et al., 2010; RAZA et al. 2018).

De todos os materiais disponíveis à base de PHB que são utilizados em diferentes tratamentos, as nanopartículas têm recebido maior atenção, em especial as nanocápsulas de PHB. O emprego das NP-PHB, assim como de outras nanopartículas poliméricas comentadas anteriormente, é focado na área de *drug delivery*. Vários estudos relacionaram as vantagens no encaminhamento de fármacos anti-neoplásicos, anti-diabéticos (BABOS et al., 2020; KILIÇAY et al., 2011; YAO et al, 2008) e anti-microbianos (PERVEEN; MASOOD; HAMMED, 2020; MURUEVA et al., 2014) às características hidrofóbicas das nanocápsulas de heteropolímeros de PHB. Fármacos em geral são substâncias hidrofóbicas, pois entram facilmente nas células por difusão simples. As nanocápsulas, como comentado no item 3.1.3, favorecem a incorporação dos fármacos em seu interior, impedindo a degradação imediata do medicamento, bem como aumentando seu tempo de vida na corrente sanguínea e direcionando seu potencial

terapêutico. Além disso, segundo Zohri (2009), a absorção intestinal de polímeros hidrofóbicos, como o PHB, é superior aos hidrofílicos.

Na área imunológica, poucos estudos foram documentados utilizando micro ou nanopartículas de PHB para entrega de antígenos, o que permite que futuros estudos possam explorar essa área para o desenvolvimento de novas vacinas à base de PHB, visto suas vantagens como polímero e nanocarreador. Os estudos já existentes envolvendo vacinas de PHB são do tipo nanoesfera e serão detalhados no item 3.4, onde será abordado proteínas de fusão que funcionam como tags de ancoragem para funcionalizar essas nanopartículas com os antígenos.

3.3 Técnicas de funcionalização de proteínas em nanoesferas

Segundo Mattos (2015), o termo adsorção se refere a um fenômeno natural no qual ocorre uma separação dos componentes de uma mistura, em um determinado sistema, através da afinidade física ou química de um ou mais componentes em específico por um material adsorvente sólido ou semi-sólido. Nesse sistema, as partículas ou molécula que possuem afinidade presentes na mistura, que pode estar no estado gasoso ou líquido, se aderem à superfície do material sólido, enquanto os demais componentes da solução permanecem na fração fluída ou não adsorvida, não apresentando confinamento físico da molécula na escala espacial. O material que se deseja adsorver é chamado de adsorvato e o material sólido que adsorve é chamado de adsorvente.

O processo de adsorção pode ocorrer por meio de três formas: adsorção física, envolvendo interações intermoleculares do tipo hidrofóbicas, dipolo-dipolo, como de van de Wals, dipolo-induzido, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas; adsorção química, que ocorre por meio de ligação covalente entre os átomos do adsorvato e do adsorvente e a adsorção iônica, onde adsorvente e do adsorvato trocam íons um com o outro, estabelecendo ligações iônicas. A adsorção física é o método mais comum de imobilizar moléculas de interesse em superfícies sólidas, devido principalmente ao baixo custo de preparo dos componentes e redução de agentes químicos envolvidos no processo. Entretanto, o tipo de interação é fraco e reversível, podendo ser fortemente influenciado por agentes externos, como temperatura, pH, força iônica, agentes competidores e agitação. Dessa forma, é necessário testar o sistema de

forma empírica até encontrar a melhor condição, muitas vezes dependendo da modificação química do suporte ou o ligante para otimizar a interação (ANAL, 2018).

A escolha do melhor método de adsorção que se encaixa com o objetivo desejado varia grandemente em parte devido às propriedades do suporte adsorvente, do seu custo-benefício e da sua afinidade ao adsorvato. Um adsorvente ideal deve apresentar similaridade química com a proteína, homogeneidade topográfica, rigidez, facilidade de regeneração, não deformidade após imobilização, biocompatibilidade, biodegradabilidade e resistência microbiana. Existe uma variedade de composições de matrizes de adsorção que cumprem esses requisitos, tanto inorgânicos como sílica, vidro, metais, carvão ativado, como suportes orgânicos, como os polímeros de alginato, quitosana, quitina, celulose, pectina, carrageninas, sepharose, PEG, PVC e DEAE (ANAL, 2018).

As técnicas de imobilização de moléculas em suportes sólidos têm sido muito aplicadas na área industrial e acadêmica para imobilização de enzimas. As barreiras mais recorrentes de utilizar enzimas livres em processos biológicos é o alto custo de produção e purificação, instabilidade da estrutura tridimensional quando isoladas do seu ambiente natural e perda de atividade devido às condições do processo ou inibição pelo substrato ou produto. Isto resulta em um tempo de meia-vida operacional curto e, conseqüentemente, um custo elevado. Além disso, muitas enzimas que atuam na forma solúvel em meio aquoso contaminam o produto desejado e não podem ser recuperadas do meio reacional na forma ativa. Por esse motivo, confinar uma enzima em suporte sólido favorece a especificidade e seletividade das reações, a atividade e estabilidade das enzimas frente as variações de condição do meio reacional, além da possibilidade de reutilização do biocatalisador. Diferentes métodos podem ser escolhidos para imobilizar enzimas (Figura 9): encapsulação em membranas poliméricas; confinamento em matrizes poliméricas; adsorção química em matrizes insolúveis ou em resinas de troca iônica ou por reticulação (ANAL, 2018; SOUZA et al., 2017).

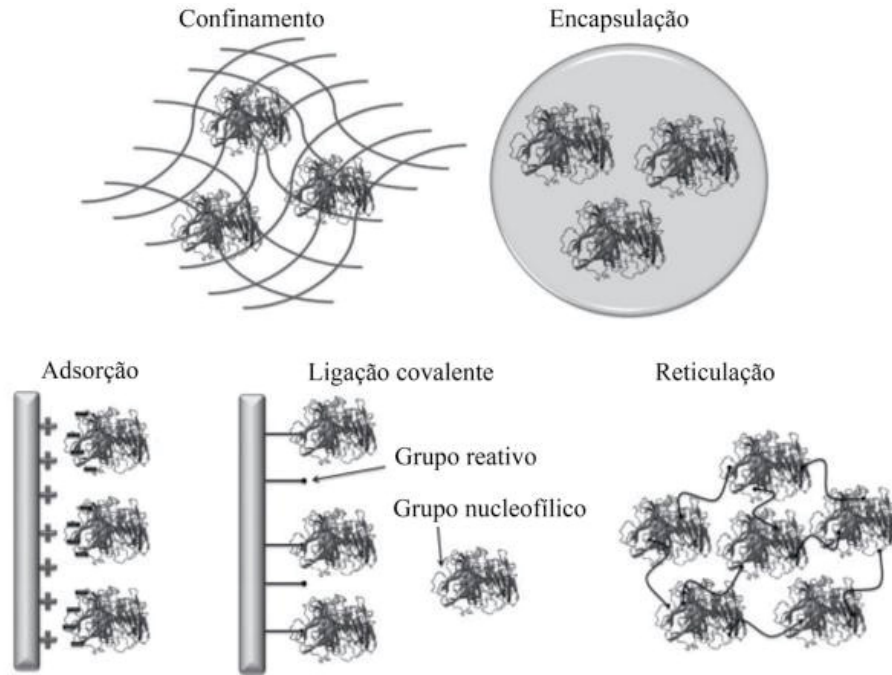


Figura 9. Diferentes métodos de imobilização de proteínas em suportes sólidos. No método de adsorção, os processos podem ser aprimorados por biologia sintética com o auxílio de *likers* e *tags*, discutidas detalhadamente na secção 3.4. Fonte: Souza et al., 2017.

Nos últimos anos, as nanopartículas têm substituído os suportes convencionais porque apresentam maior área superficial, propriedades mecânicas próprias da nanoescala derivadas do efeito quântico e uma dinâmica espacial livre, permitindo que alguns desses nanomateriais possam ser reutilizáveis (ANAL, 2018). Em nanotecnologia, o termo funcionalização se refere à atividade de fornecer características adicionais às nanopartículas através da adsorção de biomoléculas em sua superfície. A funcionalização de uma NP pode ocorrer de forma natural, como ocorre com NPs inorgânicas *in vivo* (efeito corona) ou de forma intencional, como ocorre com as nanoesferas poliméricas e NPs lipídicas (RITZ et al., 2015). Existe várias finalidades de tornar uma superfície biofuncionalizada ou bioativa: melhoramento enzimático, *microarrays*, diagnóstico e biossensores e entrega de fármacos, ácidos nucleicos, proteínas e moléculas terapêuticas.

As nanoesferas de PHA são feitas preferencialmente de homopolímeros, pois o PHB mais puro apresenta maior cristalinidade. PHB mais amorfo ou heteropolímeros de PHB possuem propriedades mais elásticas e menos tênsil, favorecendo seu uso como nanocápsulas. Dessa forma, faz-se necessário utilizar homopolímeros de PHB na constituição de nanoesferas, com uma matriz sólida que facilite a adsorção de proteínas na sua superfície (TEBALDI et al. 2019). Diferentes métodos estão disponíveis para imobilizar proteínas em nanoesferas.

Entretanto, o uso de tags de afinidade, como será discutido no tópico 3.4, aparenta ser o mais eficaz, uma vez que a forma de adsorção é mais específica em detrimento dos demais métodos, o que favorece uma forte interação entre a proteína e o suporte por maior tempo.

A enzima Sortase A (SrtA) de *Staphylococcus aureus*, por exemplo, tem ganhado atenção na área de imobilização de proteínas em nanopartículas nos últimos anos. Essa transpeptidase de cisteína, comum em todas as bactérias Gram positivas (RAWLINGS; SALVESEN, 2012), consegue ancorar, por transpeptidação, qualquer proteína de interesse contendo um motivo LPETG na sua porção C-terminal a qualquer molécula ou suporte que contenha uma triglicina (Gly-Gly-Gly) N-terminal para atuar como nucleófilo na reação (NAVARRE; SCHNEEWITZ, 1994). No estudo de Fauser e colaboradores (2020), por exemplo, a SrtA foi utilizada para conjugar proteínas de interesse (GFP-enzima-LPETG) contendo o sítio de reconhecimento e clivagem para sortase (domínio LPETG) com nanopartículas magnéticas revestidas por triglicina (GGG). Vários estudos semelhantes utilizaram a SrtA também na área de *drug delivery* (HAGEMEYER et al., 2014; LEUNG et al., 2012), na imobilização de enzimas em superfícies planas (CHAN et al., 2007; CLOW et al., 2008; PARTHASARATHY et al., 2007), na funcionalização de nanopartículas com fins diagnósticos de imagem (MASSA et al., 2016; ZHANG; YAMAGUCHI; NAGAMUNE, 2015), e até na constituição de vacinas (FANG et al., 2017; FARNÓS et al., 2020; GARUFI et al., 2012; OLIVERA-UGARTE et al., 2022; TANG et al., 2016; THÉRIEN et al., 2017).

3.4 Proteínas de ancoragem (*tags*) como técnicas de funcionalização

Atualmente a tecnologia de DNA-recombinante tem sido introduzida em diferentes áreas da biotecnologia. *Tags* ou proteínas de fusão são proteínas, domínios ou curtos peptídeos que são engenheirados sinteticamente na porção C ou N-terminal de proteínas alvo, com o objetivo de aumentar a expressão de proteínas ou ainda possibilitar avantajá-las com características extrínsecas a ponto de serem purificadas, monitoradas e estudadas mais detalhadamente. As diferentes *tags* variam em tamanhos e possuem diferentes propriedades, as quais podem ser anexadas ao polipeptídeo de interesse para permitir que o mesmo apresente características desejáveis ao objetivo em que se deseja trabalhá-lo. Com base em suas funções, as *tags* são divididas em *tags* de purificação, como 6His; *tags* de solubilidade, como GST (*Glutathione-S-transferase*) e *tags* de identificação/marcação, como GFP (*Green Fluorescent*

Protein). Múltiplas *tags* podem ser planejadas para a mesma proteína para que ela obtenha funções diferentes (BURGESS; DEUTSCHER, 2009).

A grande maioria das proteínas de fusão estão intimamente relacionadas a estudos de afinidade e processos de purificação de proteínas recombinantes. Em geral, *tags* menores, como oligopeptídeos, apresentam certas vantagens em sua escolha de utilização, devido principalmente à alta demanda energética no qual as células são submetidas ao tentar superexpressar proteínas de fusão de alto peso molecular recombinadas à proteína de interesse. A *tag* MBP (*Maltose Binding Protein*), por exemplo, de aproximadamente 43 kDa, pode influenciar no dobramento da proteína de interesse quando recombinada a ela durante o processo de síntese, interferindo diretamente na sua atividade biológica, na sua solubilidade e na sua manipulação. Estima-se que cerca de 5 mg de MBP sejam necessários para cada proteína alvo a ser produzida. Além disso, *tags* pequenas, como His6, não interferem em estudos de cristalização e apresentam baixo potencial de interferência no seu dobramento (BURGESS; DEUTSCHER, 2009).

Na vacinologia, essa técnica tem favorecido a eficácia e a produção das vacinas de subunidades recombinantes em detrimento das vacinas de subunidades nativas e as vacinas tradicionais (celulares/atenuadas). Entre as diferentes vantagens, pode se mencionar principalmente a versatilidade de escolha do carreador do antígeno, a manipulação da imunogenicidade do epítipo de escolha, a facilidade de purificação do antígeno e da versatilidade do hospedeiro heterólogo para expressão do antígeno recombinante, preferencialmente visada para produção em larga escala, custo barato e alto rendimento (HANSSON; STALH, 2000).

A *tag* Spy já foi utilizada para produção de vacinas e imobilização de GFP e enzimas em suportes sólidos, como hidrogéis de agarose. Nesse sistema, essa *tag* derivada do domínio CnaB2 da proteína de ligação a fibronectina (*fibronectin-binding protein*) ou FbaB de *Streptococcus pyogenes* foi recombinada geneticamente à GFP, enzimas e antígenos para se ligar especificamente a uma proteína receptora sintética, de aproximadamente 116 resíduos de aminoácidos, denominada SpyCatcher, presente no suporte sólido. *Tags* baseadas em sequências repetidas de aminoácidos já foram utilizadas para imobilizar GFP e RFP em diferentes suportes. Nesses ensaios, as proteínas fluorescentes foram recombinadas a 6His-*tag*, Cys-*tag* e Lis-*tag* para promover a imobilização em hidrogéis de grafeno 3D, micropartículas de grafeno revestidas por grupos epóxi e sulfatos e nanopartículas de grafeno contendo grupos carboxílicos terminais, respectivamente (BENÍTEZ-MATEOS et al., 2019).

Até o momento, o registro de vacinas à base de NP de PHB testadas só fizeram uso da *tag* PhaC (PHB polimerase) como proteína de ancoragem de antígenos recombinantes (GONZALEZ-MIRO et al., 2019). O grupo pioneiro na utilização dessa *tag* foi Parlane et al. 2012 e Martinez-Donato et al. 2013 contra tuberculose e hepatite C, respectivamente. Mais recentemente, em 2021, um grupo australiano também utilizou a *tag* PhaC de *R. eutropha* recombinada ao antígeno S do Sars-Cov-2 como estratégia vacinal contra o novo coronavírus. Neste estudo, os antígenos recombinantes foram expressos em dois sistemas heterólogos: *E. coli* BL21 (DE3) e células S1 de insetos através da *tag* Spytag/SpyCatcher. Ambas as estratégias induziram imunidade protetora no modelo de infecção por SARS-CoV-2 em hamster, conforme demonstrado pela redução dos títulos do vírus até a eliminação viral nos pulmões após a infecção (CHEN et al., 2022).

Nas plataformas diagnósticas, a *tag* PhaC foi utilizada para detectar antígenos virais e bacterianos (CHEN et al., 2014; GRAGE; REHM, 2008). A fasina PhaP, embora nunca tenha sido utilizada em plataformas de vacinação, já foi utilizada também para ancorar antígenos em plataformas diagnósticas (ATWOOD; REHM, 2009; BACKSTROM; BROCKELBANK; REHM, 2007) e na engenharia de tecidos (LI et al., 2014). Diferentes sistemas heterólogos de expressão também foram usados para purificar proteínas com *tag* PhaP (BANKI; GERNGROSS; WOOD, 2005; BERNARD et al., 2005; WANG et al., 2008), *tag* PhaF (MATO-BLANCO, 2020) e para imobilizar enzimas nas nanoesferas de PHB usando PhaP e PhaC (BALTFORD et al., 2012; MULLANEY; REHM, 2010; PETERS; REHM, 2006; RASIAH; REHM, 2009).

A utilização da *tag* PhaC, entretanto, apresenta algumas desvantagens atreladas à mensuração e identificação precisa da resposta imune. Como mencionado anteriormente no item 3.2.3, a PHB sintase (PhaC) produz o grânulo a partir do *pool* de moléculas de 3HB citoplasmáticas, sendo, portanto, aderidas concomitantemente à formação dos grânulos. Nesse sentido, proteínas acessórias ancoradas aos grânulos, como GAPs da família das fasinas, podem estar ancoradas junto à PhaC-antígeno no PHB e estabelecer reações cruzadas durante o processo de resposta imune. Ao mesmo tempo, a presença de outras proteínas associadas aos grânulos também pode contribuir positivamente na resposta imune como adjuvantes, caso o antígeno de escolha recombinado à PhaC apresente baixa imunogenicidade. Dessa forma, surge a necessidade de testar outras proteínas de fusão associadas à natureza do PHB, como PhaZ, para constituição de imunizantes, uma vez que tais etiquetas possibilitem imobilizar antígenos

de alta imunogenicidade, de forma isolada aos grânulos, e eliciar respostas humorais mais específicas e eficazes, minimizando, inclusive, a ocorrência de reações cruzadas.

3.5 Domínio SBD (*Substrate Binding Domain*)

As PHA depolimerases ou PhaZ são enzimas do metabolismo de microrganismos produtores ou consumidores de PHA, responsáveis pela depolimerização em número e tamanho dos grânulos (FUJITA et al., 2005; HIRASHI et al., 2006; 2010^{a,b}). Consequentemente, essas enzimas também contribuem na disponibilização direta de substrato energético em circunstâncias de escassez de energia, de nutrientes, de estresse celular e de choque térmico (ALVES et al., 2020; MULLER-SANTOS et al., 2020). Até o momento, têm se classificado as PHA depolimerases em dois grupos, dependendo do seu substrato. O primeiro grupo pertence às i-PhaZ ou PHA depolimerases intracelulares, que degradam apenas PHA nativos (nPHA), restritos à reserva energética. Já as PHA depolimerases extracelulares ou e-PhaZ são mais elucidadas e descritas bioquimicamente, pois são encontradas na maioria dos microrganismos produtores e consumidores de PHA extracelular (HERMAWAN; JENDROSSEK, 2009; JENDROSSEK et al., 2013; PAPAGEORGIOU et al., 2008; WAKADKAR et al., 2010).

Com algumas exceções, ambas as classes de PhaZ descritas apresentam 3 domínios bem definidos e conservados, responsáveis por etapas diferentes na degradação enzimática do poliéster (HIRAISHI et al., 2010^a; PAPAGEORGIOU et al., 2008). O domínio N-terminal apresenta um sítio α/β hidrolase, homólogo ao padrão catalítico e estrutural da Lipase A (LipA) de *Bacillus subtilis*. Basicamente este domínio é composto de 11 folhas- β e 8 α -hélices, que resguardam a tríade de aminoácidos S136-W242-H306 no seu sítio ativo. O resíduo de serina (Ser) é o resíduo chave do box conservado de pentapeptídeos (Gly-X-Ser-X-Gly) que constituem o sítio ativo das lipases e outras serino hidrolases. Uma região linker maleável, rica em resíduos de treonina (Thr), que conecta o domínio catalítico N-terminal ao domínio C-terminal. Também denominado SBD (*Substrate Binding Domain*), este domínio, por sua vez, é responsável pela etapa da adsorção da enzima ao substrato (PAPAGEORGIOU et al., 2008; WAKADKAR et al., 2010).

Segundo Kikkawa et al. (2005), a etapa de adsorção da enzima ao PHB ocorre independente do domínio catalítico e possui uma cinética própria de adsorção, a qual é irreversível e não altera a superfície do polímero após a sua imobilização. Entretanto, a atividade catalítica do domínio N-terminal é totalmente dependente da etapa de associação,

realizada pelo domínio SBD anteriormente. Por esse motivo, os pesquisadores acreditam que o processo de associação e degradação do grânulo *in vivo* ocorre em duas etapas, sendo cada uma realizada pelos domínios diferentes.

Kasuya et al. (1999) foram os primeiros a descobrir a função adsortiva de PhaZ7 de três diferentes espécies de microrganismos (*R. pickettii*, *Pseudomonas stutzeri* e *Comamonas acidovorans*) aos grânulos de PHB. Entretanto, só em 2003, com Kasuya et al., que SBD foi elucidado como um domínio de PhaZ em *Marinobacter* sp. NK-1 e que executa apenas a função de adsorção, sem envolvimento direto com a depolimerização do PHB. Tais resultados impulsionaram posteriormente a busca, em diferentes espécies, por quais aminoácidos da sequência que compõem o domínio SBD são essenciais para adsorção ao PHB.

Um importante estudo realizado por Hirashi *et al.* em 2006 identificou uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos (T412, T428, T443, T445, L441, V415, V457 e A448) mesclada com a presença de resíduos de Ser nas posições S410, S432 e S445 compondo a superfície do domínio SBD de PhaZ de *R. pickettii* T1. Através de mutagênese aleatória, foi sugerido que esses aminoácidos são essenciais para ligação ao PHB. Conforme ilustra a Figura 10, acredita-se que os aminoácidos hidrofóbicos dessa sequência interagem por interações hidrofóbicas com os radicais metilas da superfície do PHB, enquanto os resíduos de Ser provavelmente estão conectados por pontes de hidrogênio com os grupos ésteres do polímero.

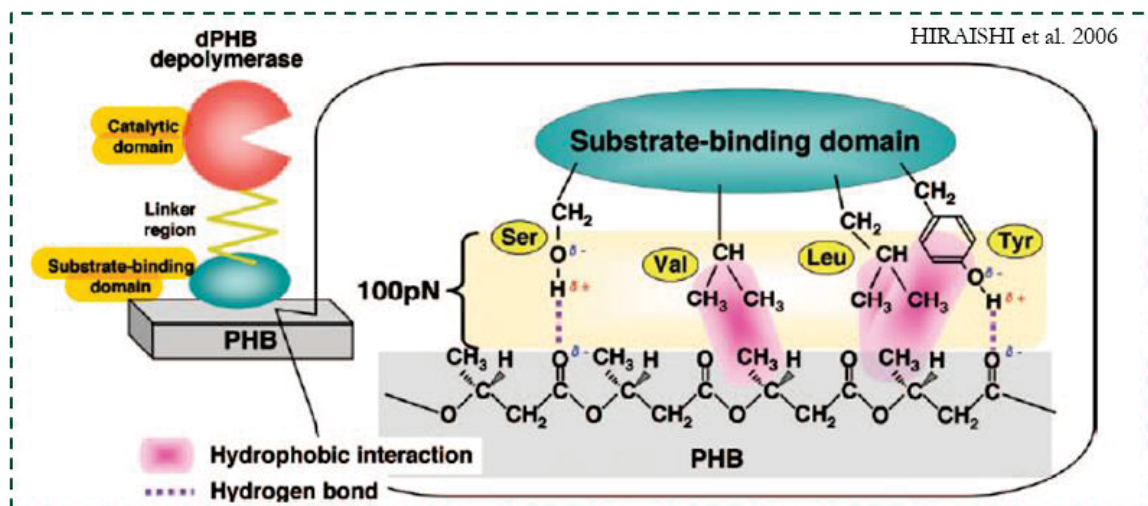


Figura 10. Modelo representativo da interação entre os resíduos de aminoácidos do domínio SBD com a superfície de PHB. Nota-se que as interações hidrofóbicas e de hidrogênio entre a superfície de um grânulo de PHB com os aminoácidos conservados que compõem o domínio SBD de PhaZ (ou dPHB depolymerase) de *R. pickettii* T1 são essenciais para manter a adsorção da proteína no grânulo. Fonte: HIRASHI et al., 2006.

Nesse sentido, a elucidação de aminoácidos essenciais na composição de *tags* anfífilas que conectam proteínas de interesse a nanopartículas de PHB fornecem um terreno

fértil para o avanço contínuo do PHB na biotecnologia e engenharia biomédicas. Embora a PhaC ofereça a vantagem de favorecer a ligação covalente entre a proteína de interesse e o biopolímero de PHB na constituição de vacinas e testes diagnósticos, evitando adsorção de proteínas inespecíficas (DINJASKI; PRIETO, 2013), a sua sequência de aminoácidos chaves para entender a interação com o polímero é desconhecida. Por outro lado, a sequência de aminoácidos de SBD de PhaZ é mais elucidada, o que favorece seu uso em diagnósticos e desenvolvimento de imunizantes (IHSSSEN et al., 2009; PARK et al., 2005; 2009). Até o momento, apenas pesquisas aplicadas ao diagnóstico de agentes infecciosos e proteínas fluorescentes foi realizada utilizando o domínio SBD de PhaZ como agente de ancoragem ao PHB (LEE et al. 2006; PARK et al., 2005; 2006). É esperado que futuros investimentos na tag SBD de PhaZ possam ser aproveitadas a fim de suprir a lacuna biotecnológica de seu uso, bem como aproveitar sua utilização além da fronteira imunológica, mas para tratamento de doenças mais complexas, como imunoterapias contra o câncer, por exemplo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MÉTODOS DE MICROBIOLOGIA

4.1.1 Estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho para superexpressão de proteínas recombinantes foram listadas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Estirpes bacterianas utilizadas nesse trabalho.

Estirpes	Características	Referência/fonte
<i>Escherichia coli</i> Top 10	Utilizada para transformação bacteriana utilizando DNA plasmidial, bem como para minipreparação plasmidial em etapas de clonagem. <i>SmR</i> ; <i>F- mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 nupG$ <i>recA1 araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galE15 galK16 rpsL end A1</i> λ -.	INVITROGEN Inc.
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Utilizada para superexpressão de proteínas utilizando os vetores da família pET. <i>hsdS</i> , <i>gal(clts 857 ind1 Sam7, nin5 lacUV5-T7 geneI)</i> .	(SAMBROOK et al., 1989)

4.1.2 Meios de cultura, antibióticos e estoque de microrganismos

Os meios de cultura utilizados para o crescimento de bactérias competentes e transformadas neste estudo foram listados na Tabela 2.

Tabela 2. Meios de cultivo utilizados nesse trabalho.

Meio	Composição	Referência
LB (<i>Luria Bertani</i>)	Triptona (10 g/L) Extrato de levedura (5 g/L) NaCl (10 g/L)	(SAMBROOK et al., 1989)
LA (<i>Luria Bertani</i> Ágar)	Triptona (10 g/L) Extrato de levedura (5 g/L) NaCl (10 g/L) Ágar (15 g/L)	(SAMBROOK et al., 1989)
TB (<i>Terrific Broth</i>)	Triptona (12 g/L) Extrato de levedura (24 g/L)	(TARTOF; HOBBS, 1987)

Glicerol 100% (4 mL/L)
 KH₂PO₄ (0,17 M) (100 mL/L)
 K₂HPO₄ (0,72 M) (100 mL/L)

As soluções de antibióticos utilizadas para seleção positiva das colônias bacterianas transformadas neste estudo, bem como suas condições de armazenamento, foram listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Antibióticos utilizados nesse trabalho.

Antibiótico	Concentração final	Plasmídeo
Ampicilina (Amp)	250 µg/mL	pSB1A2-sfGFP
Canamicina (Km)	100 µg/mL	pET28a e pET29b

*Todas as soluções de estoque de antibiótico foram armazenadas sob 4° C e preparadas conforme SAMBROOK et al. (1989).

O estoque de *E. coli* transformadas com plasmídeos de subclonagem foi armazenado em glicerol 50% a -20° C, enquanto o armazenamento de *E. coli* competentes foi realizado em freezers a -80° C em CaCl₂ (0,1 M) e glicerol 15%.

4.1.3 Preparo de células competentes

As diferentes estirpes de *E. coli* utilizadas neste estudo (item 4.1.1), armazenadas em glicerol 50% a -20° C, foram plaqueadas utilizando palitos estéreis em placas de Petri de poliestireno de 90 mm x 14,2 mm contendo 30 mL de meio LA, sem antibiótico, em estufas de 37° C por 16 h para obtenção das colônias. As colônias isoladas foram inoculadas em 3 mL de meio LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2000) em frascos de penicilina de capacidade de 10 mL, sem antibiótico, sob agitação de 120 rpm a 37° C por 16 h.

Após o crescimento bacteriano, 1 mL do pré-inóculo foi inoculado em 100 mL de meio LB, sem antibiótico, em Erlenmeyers de 500 mL. O inóculo foi então incubado em *shakers* de 37° C e 180 rpm até a obtenção de uma DO₆₀₀ entre 0,3 a 0,4. O inóculo foi centrifugado em dois tubos falcons de 50 mL por 10 min, a 4°C em 4.000 rpm em centrifuga Eppendorf (modelo 5810R). Após o descarte do meio de cultura, o *pellet* de células foi ressuscitado com 25 mL de uma solução gelada de CaCl₂ (0,1 M) e deixado em banho de gelo por aproximadamente 1h para permeabilização da membrana.

A cultura foi então centrifugada novamente a 4.000 rpm, por 10 min a 4 °C, com remoção do sobrenadante e posterior ressuspensão, em gelo, do *pellet* em 1,5 mL de CaCl₂ (0,1 M) e glicerol 15 %. A solução ressuspensa foi distribuída em alíquotas de 100 µL para microtubos de 1,5 mL, identificados e armazenados em freezers a - 80° C.

4.2 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA

4.2.1 Plasmídeos utilizados nesse trabalho

Todos os plasmídeos utilizados neste trabalho para superexpressão de proteínas recombinantes, bem como a descrição de suas características, foram listadas na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Plasmídeos utilizados nesse trabalho.

Plasmídeo	Características	Fonte/Referência
pET28a (+)	Vetor de expressão. Promotor T7, <i>lacI</i> , <i>KmR</i> , sequência codificadora para a caudas de histidina N e C-terminal.	Novagen (2023)
pET29b (+)	Vetor de expressão. Promotor T7, <i>lacI</i> , <i>KmR</i> , sequência codificadora para a cauda de histidina C-terminal	Novagen (2023)
pSB1A2	Vetor de clonagem. Promotor J23104, <i>AmpR</i> .	iGEM (2004)
pET29b-sfGFP-sSBD	Vetor pET29b contendo o gene recombinante <i>sfGFP-sSBD</i>	Este trabalho. Sintetizado por GenScript (EUA)
pET29b-sfGFP-sSBDA	Vetor pET29b contendo o gene recombinante <i>sfGFP-sSBDA</i>	Este trabalho. Sintetizado por GenScript (EUA)
pET28a-sfGFP-SBD	Vetor pET28a contendo o gene recombinante <i>sfGFP-SBD</i>	Budel, Maria Luisa T. (2022)
pSB1A2-sfGFP	Vetor pSB1A2 contendo o gene <i>sfGFP</i> de <i>Aequorea victoria</i>	Miranda, Brenno W. (2021)

4.2.2 Extração de DNA plasmidial (minipreparação)

A metodologia de lise alcalina, descrita inicialmente por SAMBROOK et al. (2000), foi utilizada para a obtenção e manipulação dos diferentes DNA plasmidiais utilizados neste trabalho (4.2.1) a partir das estirpes de *E. coli* transformadas (Tabela 4.1.1). As colônias bacterianas em placas de Petri armazenadas a 4°C foram inoculadas em meio líquido de 3 a 10 mL de meio LB em frascos de penicilina de 3 a 10 mL, respectivamente, contendo o antibiótico

específico de resistência ao plasmídeo na proporção de 1:1.000, conforme indicado na Tabela 3 (item 4.1.2).

Após o cultivo em meio líquido a 37°C por 16 horas sob agitação de 120 rpm, as culturas foram transferidas para microtubo de 2 mL e centrifugadas em centrífugas Minispin Eppendorf a 13.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi removido e o pellet celular foi ressuspensionado por 150 µL de solução GET contendo RNase (50 mM de glucose; 10 mM de EDTA; 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1 µL de RNase (10 mg/mL)). Após 5 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado 150 µL de solução de lise (0,18 M de NaOH e 1% de SDS (m/v)), e a solução foi homogeneizada lenta e manualmente por 20 segundos. A solução então foi neutralizada pela adição de 150 µL de Kacf (3 M de acetato de sódio e 11,5% de ácido acético (v/v)), com uma nova inversão manual dos tubos por 20 segundos. Em seguida, foi adicionado 100 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e a solução foi levada a um pulso no vórtex por 3 segundos.

Os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos microtubo identificados. Foram adicionados 250 µL de isopropanol 100%, a solução foi homogeneizada por 3 minutos no vórtex e deixada em banho de gelo por 20 minutos. Os tubos então foram centrifugados a 15.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de etanol 70% (v/v). Após uma nova centrifugação a 15.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco a 60°C por 2 minutos em estufa. O precipitado de DNA plasmidial seco foi solubilizado em 30 µL de água ultrapura estéril. A qualidade da extração foi monitorada por eletroforese de DNA em gel de agarose (item 4.2.5).

4.2.3 Transformação bacteriana por choque térmico

Para a transformação bacteriana, 2 µL de plasmídeo foram adicionados a 100 µL de bactérias competentes armazenadas a -80°C em microtubos de 1,5 mL, ou 10 µL da solução da reação no caso das reações de ligação de DNA. A mistura foi incubada em banho de gelo por 30 a 40 minutos. Em seguida, foi realizado o choque térmico em banho de água aquecida a 42°C por 45 segundos. Após 2 minutos em gelo, foi adicionado 900 µL de meio LB e os tubos foram incubados por 1 h em estufa a 37°C para recuperação das células.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados em minispin por 15.000 rpm por 2 minutos, foram removidos 700 μL de meio sobrenadante e 300 μL da suspensão bacteriana foi plaqueada em placas de Petri contendo meio LA com antibiótico, de acordo com a resistência conferida pelo plasmídeo utilizado. As placas foram incubadas em estufa à 37°C por 16 horas para o crescimento das colônias. A transformação foi confirmada através da extração de DNA plasmidial das colônias cultivadas em meio LB, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989) (item 4.2.3), e avaliadas por eletroforese em gel de agarose (item 4.2.5).

4.2.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Para as análises de extração e restrição de DNA plasmidial, géis de agarose foram preparados em tampão TAE (40 mM de Tris base; 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA a pH 8,0) na concentração de 1% (m/v). A cada 2 μL de amostra, foi adicionado 2 μL do corante FSUDS (azul de bromofenol 0.8% (m/v), ficol 10% (m/v), xileno cianol 0.4% (m/v), SDS 1% (m/v), EDTA 1,8 mM, pH 8,0) em microplaca. A mistura foi aplicada ordenadamente nos poços do gel na presença de tampão TAE 1x banhando a cuba horizontal Biorad (Califórnia, EUA). Três μL de marcador de peso molecular de DNA (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas) também foram adicionados aos poços. A corrida foi realizada a 80 V e aproximadamente 40 mA por 50 minutos.

Após a separação, o gel com DNA foi incubado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 20-30 min. O DNA foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta a 312 nm (EC3 System - UVP BioImaging Systems UVP, Inc. Upland, CA USA) acoplado a um fotodocumentador de vídeo-imagem.

4.2.5 Digestão de DNA plasmidial com endonucleases

Para as reações de clivagem de DNA que permitiram a confirmação prévia dos plasmídeos, endonucleases de restrição e tampões comerciais da Thermo Fisher Scientific e New England Biolabs Inc. foram utilizadas em reações de restrição no volume final de 10 ou 20 μL . O volume e concentração de cada componente (DNA, enzimas e tampão), assim como o tempo de incubação e temperatura, foram as sugeridas pelos fabricantes. As reações foram confirmadas realizando eletroforese de DNA em gel de agarose (item 4.2.5).

4.2.6 Construção dos plasmídeos recombinantes para expressão das variantes

Os plasmídeos pET29a-sfGFP-sSBD e pET29a-sfGFP-sSBDA (tabela 4, item 4.2.1), destinados à expressão das variantes SBD (ambas de peso molecular de 33,6 kDa), foram construídos sinteticamente pela empresa GenScript (EUA). A construção foi planejada utilizando a sequência codificadora base para proteína sfGFP de *Aequorea victoria* (Pédelacq et al. 2006) na porção N-terminal, seguida da sequência das variantes SBD, derivadas da sequência primária que codifica para o domínio SBD da enzima PhaZ de *Rashtonia pickettii* T1, na porção C-terminal. As variantes, como mencionadas na seção 1, foram planejadas para obter um domínio SBD mais curto e com nenhum ou apenas 1 único resíduo de cisteína na sua composição. As sequências completas de aminoácidos dessas variantes podem ser identificadas nos anexos IV e V desta dissertação.

Os códons para o gene recombinante foram otimizados para expressão em *E. coli*. Para melhor purificação das proteínas, os genes recombinantes foram planejados para expressar a cauda de seis histidinas na porção C-terminal, derivada do próprio plasmídeo pET29b (+). O promotor T7 também pertencia ao plasmídeo, o qual controlou a expressão do gene alvo.

4.2.7 Construção dos plasmídeos recombinantes para expressão dos controles

O plasmídeo pET28a-sfGFP-SBD (tabela 4, item 4.2.1), destinado à expressão da proteína controle positivo neste projeto (sfGFP-SBD; 33 kDa), foi construído e adquirido por Maria Luiza Terribile Budel. O plasmídeo contém o promotor T7 para expressão e cauda de 6 histidinas na porção C-terminal para purificação em resina de afinidade.

Já o controle negativo (sfGFP; 26,8 kDa) foi adquirido a partir do plasmídeo pSB1A2-sfGFP (Tabela 4, item 4.2.1), construído pelo mestrando Brenno Wendler de Miranda. Este plasmídeo contém um promotor constitutivo forte J23104 e RBS (*Ribosome Binding Site*) BBA_0034, mas com ausência de cauda 6His.

4.3 EXPRESSÃO E MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.3.1 Superexpressão das proteínas recombinantes

Para testar a melhor condição de expressão das proteínas utilizadas neste estudo, todos os plasmídeos recombinantes destinados à expressão foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3), (exceto o sfGFP, que funcionou como controle negativo), e então submetidos a testes de expressão. Pelo menos 3 colônias de cada placa foram inoculadas em 3 mL de meio LB em frascos de penicilina de 3 mL e antibiótico de resistência adequado ao plasmídeo. A cultura foi incubada por 16 h em agitador orbital a 37° C e 120 rpm. Após 16 h, 100 µL do pré-inóculo foi transferido para 10 mL de meio LB sem antibiótico (proporção 1:100) e o inóculo foi então incubado a 37° C em 180 rpm até atingir a DO₆₀₀ de 0,4 a 0,5. Com exceção da proteína sfGFP, a partir desse ponto, diferentes concentrações do indutor IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) foram testadas, bem como as condições de temperatura de incubação e tempo de expressão com o indutor.

Após o período determinado nas condições específicas testadas, a cultura foi transferida em tubos de 15 mL estéreis e centrifugados em centrífuga Eppendorf (modelo 5810R) a 7.000 x g, por 5 minutos a 4° C. Após o descarte do meio (sobrenadante), o *pellet* de células foi ressuspensa em 500 µL de um buffer de sonicação de composição variada (pH 8,0). A cultura ressuspensa foi submetida à lise celular por sonicação (*Ultrasonic Processor* Fischer - Sonics Vibra-Cell VC 505) em 8 ciclos de 20 segundos x 20 segundos de descanso em banho de gelo. Cerca de 20 µL de extrato bruto foram armazenados em gelo para posterior análise da fração por SDS-PAGE (item 4.3.2). Após a sonicação, cerca de 480 µL de extrato bruto foi centrifugado a 12.000 x g, por 15 minutos a 4°C para separação das frações solúvel e insolúvel. A fração insolúvel foi ressuspensa com 500 µL do mesmo buffer de sonicação. A análise da expressão das proteínas nas suas diferentes frações (bruto, insolúvel e solúvel) foi feita por eletroforese de proteínas em condição desnaturante (item 4.3.2), aplicando 10 µL de cada fração no gel de poliacrilamida a 12% (m/v).

O controle das expressões foi feito com os plasmídeos pET28a/pET29b e pSB1A2 vazios (para sfGFP) (item 4.2.1), transformados em *E. coli* BL21 e *E. coli* Top10, respectivamente, reproduzindo as mesmas condições do teste de expressão.

4.3.2 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE)

As análises de expressão, purificação e imobilização de proteínas nas nanopartículas foram feitas utilizando a técnica de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). Os géis separadores e de empilhamento de poliacrilamida foram montados em sistema vertical (modelo Biorad - Califórnia, EUA), nas concentrações de 12% e 4% de acrilamida, respectivamente.

As amostras foram misturadas em volumes variados de tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L⁻¹ de Tris-HCl pH 6,8 e 5% de β-mercaptoetanol), dependendo do ensaio. A mistura então foi desnaturada quando submetida à fervura em banho seco a 100° C, por 5 minutos e centrifugadas a 15.000 rpm por 10 segundos. 10 µL da proteína misturada ao tampão de amostra então foram aplicados nos poços do gel, na presença de tampão Tris-Glicina (3 g/L⁻¹ de Tris-base, 14 g/L⁻¹ de Glicina e 1 g/L⁻¹ de SDS) e a corrida foi iniciada a 200 V, com amperagem variada, na cuba da Biorad.

Após a corrida, os géis foram corados com o corante *Coomassie Blue* R-250 (0,05%, V/V⁻¹), descorados em solução de metanol e ácido acético (10%, V/V⁻¹) e visualizados em transluminador.

4.3.3 Dosagem colorimétrica de proteínas

A dosagem de proteínas totais após a etapa de purificação (item 4.3.7) foi feita por ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). Os ensaios de quantificação em microplaca de 96 poços foram feitos seguindo as determinações do fabricante do reagente de Bradford (Biorad). As reações continham 30 µL de amostra e 170 µL de reagente (100 mg de *Coomassie Blue* G-250; 50 mL de etanol 95% e 100 mL ácido fosfórico 85%). Para a curva padrão, foi utilizada a proteína albumina de soro bovino (BSA) em concentrações de 20 a 100 µg/mL. A medida de absorbância foi realizada em leitor de microplacas (*BioTek Synergy LX Multimode Reader* da AgilentTM) em comprimento de onda de 595 nm.

4.3.4 Fluorimetria para dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas fluorescentes por fluorimetria realizada nos ensaios de imobilização e após as purificações foi realizada em microplacas pretas de poliestireno de 96 poços (Corning Incorporated - Life SciencesTM – REF3603), aplicando o volume fixo de 100 μ L de amostra. O filtro BioTek Green Synergy LX da AgilentTM foi utilizado acoplado no leitor de microplacas (BioTek Synergy LX Multimode Reader da AgilentTM). Os comprimentos de onda de excitação e emissão para GFP utilizados foram de 485/528 nm, respectivamente. O *gain* foi ajustado em 36 em todas as análises de saturação e 27 para as análises de rendimento de purificação (Tabela 6, item 5.1). O cálculo de conversão da intensidade de fluorescência (RFU) para massa de proteína (μ g) foi feito através de uma curva padrão de fluorescência, utilizando um gradiente de diluição da própria proteína e medindo suas intensidades de fluorescência antes da imobilização. O programa utilizado para este cálculo foi Excel 2019 e os dados foram tratados no programa Prism GraphPad 8.0.

4.3.5 Purificação de proteínas recombinantes com 6His-tag

Após determinar as melhores condições de expressão, as proteínas foram superexpressas por *E. coli* BL21 (DE3) no volume final de 200 mL de LB, com 2 mL de pré-inóculo contendo antibiótico na proporção de 1:1.000. Após a expressão, a cultura foi centrifugada a 5.000 x g, por 10 minutos a 4 °C. A ressuspensão do *pellet* ocorreu em 5 mL de tampão de sonicação (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM de NaCl e 20 mM de imidazol, pH 8,0) e, após a lise, a centrifugação para separar as frações solúvel e insolúvel foi feita na centrífuga refrigerada Hitachi a 20.000 x g, por 20 minutos a 4° C.

Para purificar os 5 mL de extrato solúvel das proteínas contendo cauda 6His, foi utilizada a cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC). A coluna HiTrap Chelating HP (CytivaTM) de 5 mL foi carregada com 100 mM da solução de NiCl₂ e equilibrada com 2x o volume da coluna com o buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl e 20 mM Imidazol, pH 8.0). A eluição do extrato proteico na coluna ocorreu em um fluxo de 1 mL/min através de gradiente crescente de imidazol (50 mM a 400 mM) e a pureza das frações foi avaliada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As etapas de lavagem da coluna ocorreram com água destilada em um fluxo de 5 mL/min, conforme indicações do fabricante (CytivaTM).

4.3.6 Purificação da proteína controle sfGFP

Após determinar as melhores condições de expressão para a proteína sfGFP em *E. coli* Top10, 200 mL de cultivo em LB com antibiótico de resistência ao plasmídeo (Tabela 3, item 4.1.2); na DO₆₀₀ entre 0,4 a 0,5; foi deixado incubado a 30°C, sob agitação de 120 rpm por 16h. Em uma centrífuga Eppendorf (modelo 5810R), a cultura foi centrifugada a 5.000 x g, por 10 minutos a 4°C. Após o descarte do meio (sobrenadante), a ressuspensão do *pellet* ocorreu em 5 mL de tampão de sonicação (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 150 mM de NaCl). Após a lise, a centrifugação para separar as frações solúvel e insolúvel foi realizada na centrífuga refrigerada Hitachi a 20.000 x g, por 20 minutos a 4°C.

Para purificar os 5 mL de extrato solúvel da proteína sfGFP sem cauda 6His, foi adotada a estratégia de precipitação com sulfato de amônio (*salting out*) em uma faixa de 20 a 70% de saturação, com intervalos de 10%, para determinar qual a melhor faixa de concentração em que a sfGFP precipita. A tabela utilizada para o cálculo e pesagem do sal foi proposta por Scoopes (1994).

O experimento foi conduzido distribuindo 1 mL do extrato solúvel em 5 microtubos de 1,5 mL contendo a massa de sulfato de amônio pesada em balança analítica de precisão. A solução foi invertida manualmente até aparência homogênea e descansou no gelo por 30 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo identificado e o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) e NaCl (150 mM). Ao sobrenadante transferido ao novo tubo, foi adicionado a nova concentração de sulfato de amônio. A solução foi misturada manualmente e permaneceu no gelo por mais 30 minutos. A centrifugação foi feita a 10.000 x g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo identificado e o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) e NaCl (150 mM).

A análise das duas frações precipitadas e do sobrenadante de cada faixa foram analisadas por SDS-PAGE (item 4.3.2). A fração com a melhor condição de precipitação observada do sfGFP foi utilizada para remoção do sulfato de amônio por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), em uma coluna manufaturada Sephadex G50 de 5 mL. A proteína eluiu em um fluxo de 1 mL/min em 6 alíquotas de 1 mL. A coluna foi lavada antes e depois da fração proteica com 10x o volume da coluna (5 mL) utilizando o buffer Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) e NaCl (150 mM) em fluxo de 1 mL/min. As frações eluídas de sfGFP foram analisadas novamente por SDS-PAGE e quantificadas por Bradford (item 4.3.3).

4.3.7 Diálise das proteínas recombinantes

Para remover o imidazol das frações eluídas das proteínas contendo a 6His-tag, a diálise dessas frações foi realizada em membranas de acetato de celulose com cut-off de 14 kDa. Para cada 2 mL de eluato, 1L de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) e NaCl (150 mM) foi utilizado como meio de troca, por 16h em agitador automático. As frações foram analisadas por SDS-PAGE (item 4.3.2) e quantificadas por Bradford (item 4.3.3).

4.3.8 Identificação de proteínas recombinantes por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS)

A identificação das proteínas quiméricas (sfGFP fusionada com variantes de SBD) foi realizado através de espectrometria de massas de Ionização a Laser com Tempo de Voo (MALDI-TOF/MS). A banda correspondente à proteína de interesse presente no gel de poli-acrilamida após a eletroforese foi recortada e transferida para um microtubo de 1,5 mL. O corante *Coomassie Blue* e o detergente SDS da amostra foram removidos do gel utilizando 400 µL da solução descolorante (25 mM de bicarbonato de amônio, pH 8,0 e acetonitrila 50%). Após várias lavagens de 1 em 1h, o gel foi desidratado utilizando 200 µL de uma solução de acetonitrila 100%. Após 5 minutos, a acetonitrila foi descartada e a banda do gel foi seca em estufa a 37°C overnight.

Para a etapa de tripsinização da banda descolorada, foi adicionado 15 µL da solução de tripsina (1 µg/µL de tripsina Promega™, acetonitrila 10% e 50 mM de bicarbonato de amônio, pH 8,0) e incubada por 30 minutos no gelo. O gel foi em seguida fragmentado com a ponteira e incubado novamente na estufa por 12h a 37°C. A aplicação da amostra na placa metálica (Bruker Daltonics Germany – MTP 384 poços, 209519) foi feita misturando 2 µL de cada amostra tripsinizada com 2 µL da solução contendo a matriz CHCA (Ácido α -ciano-4-hidroxicinamímico na concentração de 10 mg/mL, acetonitrila 50%, TFA 2,5% e água MiliQ autoclavada), juntamente com 2 µL de calibrante, o qual consistiu em uma mistura de padrões de peptídeos conhecidos (fragmento de bradicinina 1-7, angiotensina II, angiotensina I, substância P, bombesina, substrato de renina, clip de ACTH 1-17, clip de ACTH 18-39, somatostatina 28) (Bruker Daltonics Inc.).

A análise dos peptídeos foi feita pelo espectrômetro de massa Bruker Daltonics Inc. e os espectrogramas gerados em função da massa/carga (m/z) foram visualizados utilizando o programa Flexanalysis (Bruker Daltonics Inc.). O índice de cobertura calculado para cada proteína e a lista de massa/carga obtida pela tripsinização teórica da sequência de entrada foram realizados a partir do software *Expasy PeptideMass* (https://web.expasy.org/peptide_mass/), que utiliza os bancos de dados do Swiss-Prot e do TrEMBL, caso a proteína não seja químera, como sfGFP.

4.4 FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PHB

4.4.1 Obtenção de nanopartículas de PHB

As nanopartículas de PHB foram obtidas neste estudo a partir de um protocolo adaptado de nanodálise, proposto por Shakeri *et al.* (2014). As nanopartículas utilizadas nos ensaios de imobilização e microscopias estão na concentração de 2,5 mg/mL. A preparação envolveu 25 mg de PHB comercial (Sigma Aldrich™) pesados em uma balança analítica, transferidos para um tubo de vidro de 15 mL com tampa preta e dissolvidas em 3 mL de TFE (2,2,2-trifluoroetanol) (Sigma Aldrich™). Para melhor solubilização da amostra, a solução foi incubada em banho-maria a 60°C por cerca de 3 minutos ou até que a mistura ficasse translúcida. Posteriormente, a solução foi dialisada overnight através de uma membrana de acetato de celulose com limite de exclusão de 12 kDa contra 2 L de água MiliQ autoclavada. As nanopartículas de PHB foram então utilizadas para os ensaios de caracterização física (tamanho, potencial Zeta, homogeneidade) (item 4.2.2) e funcionalização com as proteínas fluorescentes (item 4.4.3).

As micropartículas de PHB utilizadas para as caracterizações por microscopia confocal e MEV foram preparadas pela Dr^a. Isabela Dias e pelo Prof. Dr. Guilherme Picheth, através da técnica de emulsão-evaporação, proposto por Quintanar-Guerrero (1998). Basicamente, 25 mg de PHB comercial (Sigma Aldrich) foram pesados e solubilizados em 2 mL de clorofórmio em tubo de vidro de 50 mL. Foram adicionados à mistura 10 mL de álcool polivinílico ou PVA (1% (m/v)). A solução foi homogeneizada em um agitador automático de tubos (Gehaka, AV-2) por 2 minutos na velocidade máxima. O solvente então foi evaporado gradualmente por agitação magnética lenta e constante a temperatura ambiente (20-30°C) até a obtenção de microesferas homogêneas fosse obtida.

4.4.2 Caracterização físico-química de nanopartículas de PHB

Para determinar as condições de uso das nanopartículas de PHB sem a presença de proteínas, utilizada como controle para todos os testes desta pesquisa, as análises físicas e químicas de caracterização das nanopartículas foram realizadas em parceria com a Dr^a. Isabella Pereira Dias e pelo prof. Dr. Guilherme Picheth.

As análises físicas de diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersidade (PDI) e o potencial zeta das nanopartículas foram realizadas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o Zetasizer Nano ZS (Malvern). Após a preparação por nanodálise em água ultrapura por 24h, todas as suspensões de nanopartículas foram diluídas 1:10 em água ultrapura para as medições de tamanho e em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) para medições de potencial zeta. Todas as medições ocorreram a temperatura ambiente (20°C).

Para a análise química de composição, foi realizado a técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), acoplado à técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura, cuja metodologia será detalhada no item 4.4.5

4.4.3 Funcionalização de nanopartículas de PHB e eficiência de imobilização

Para funcionalizar as nanopartículas em condições ótimas, foi realizado inicialmente testes de saturação para determinar qual a concentração de proteína utilizada no ensaio satura a superfície da NP. Nestes ensaios, realizados em triplicata, em diferentes microtubos de 1,5 mL, foram preparadas soluções de 250 µL da proteína de interesse em diferentes quantidades de massa: 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 µg. O buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) e NaCl 150 mM foi utilizado para completar o volume final. 100 µL dessa solução inicial foram destinadas às análises de intensidade de fluorescência (controle) no leitor de microplaca, antes da imobilização, com o comprimento de onda adequado (485/528 nm), conforme indicado no item 4.3.4.

Posteriormente, 8 µL de nanopartícula de PHB, na concentração final de 0,02 mg/mL, foram adicionados aos tubos de ensaio e a mistura foi deixada agitando em 120 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente (20°C) no shaker Biomixer TS-2000A VDRLTM. A mistura foi

centrifugada a 15.000 rpm por 2 minutos e 250 μ L da fração não ligada (FNL) de proteínas às nanopartículas foi transferido a um novo eppendorf identificado. 100 μ L dessa fração foi transferida à microplaca preta de poliestireno para a realização das análises quantitativas por fluorescência (item 4.3.4.). O transluminador em tempo real E-Gel G6500 - *Safe Imager* (InvitrogenTM), contendo emissão de luz azul (450 a 480 nm), foi utilizado para monitorar a presença do *pellet* fluorescente nos tubos de ensaio após a remoção da FNL.

A quantificação de proteínas adsorvidas às nanopartículas de PHB foi calculada pelo método indireto através do programa Excel, subtraindo a quantidade de proteína inicial adicionada no início do ensaio da quantidade de proteína não ligada (FNL), presente no sobrenadante, a qual foi estimada por intensidade de fluorescência em leitor de microplaca. As médias de intensidade de fluorescência controle/inicial da amostra de cada concentração foram utilizadas para determinar os coeficientes linear e angular da reta que descreve a dispersão dos pontos obtidos. A partir da regressão linear, as médias de intensidade de fluorescência das frações não ligadas (FNL) foram interpoladas na reta para determinar a quantidade de proteína não ligada às nanopartículas, presentes no sobrenadante. Dessa forma, foi estimado indiretamente a quantidade de proteína ligada às nanopartículas pela diferença de proteína no sobrenadante da proteína presente no início do ensaio, antes da imobilização. Os dados obtidos para determinar o ponto em que ocorre a saturação da superfície da nanopartícula foram então ajustados a partir isoterma de Freundlich, a qual descreve e estima a eficiência de imobilização de forma matemática.

Duas a três etapas de lavagem foram realizadas ressuspensando o *pellet* de nanopartícula contendo as proteínas adsorvidas em 200 μ L de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) e NaCl 150 mM e centrifugando a mistura em minispin a 15.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante, que corresponde às frações lavadas, foi transferido a novos microtubos devidamente identificados. O monitoramento da adsorção ao *pellet* foi realizado pelo transluminador ao final de cada etapa de lavagem. As análises fluorimétricas descritas anteriormente para as FNL também foram realizadas ao final de cada etapa de lavagem para quantificar as proteínas lavadas. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

O *pellet* de NP ao final da última etapa de lavagem foi ressuspensado em 20 μ L de tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L⁻¹ de Tris-HCl pH 6,8 e 5% de β -mercaptoetanol), fervido a 100°C por 10 minutos e centrifugado por 2 minutos a 15.000 rpm, para desnaturação e liberação das proteínas adsorvidas às

nanopartículas. 10 μL do sobrenadante, contendo as proteínas desnaturadas, foi aplicado nos poços gel de poliacrilamida 12% para análise por SDS-PAGE (item 4.3.2) e sua posterior quantificação relativa por densitometria (item 4.4.4). 10 μL das FNL de cada amostra também foram misturadas a 5 μL de tampão de amostras e analisadas por SDS-PAGE e quantificadas por densitometria.

4.4.4 Análise densitométrica da imobilização de proteínas em nanopartículas de PHB

Para quantificar relativamente a quantidade de proteínas adsorvidas às nanopartículas e prever o seu ponto de saturação, a densitometria das bandas proteicas no gel de SDS-PAGE foi realizada através do software ImageJ. Essa técnica permite converter a intensidade de pixels presente na imagem da banda de proteína selecionada em uma unidade arbitrária de massa de proteína, utilizando uma banda de uma proteína de concentração conhecida como padrão. Após a visualização das bandas de proteína no gel e sua completa descoloração, imagens do gel no formato .jpg foram importadas no software e seguiram o protocolo do desenvolvedor para quantificação das bandas (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/index.html>). Um gel de SDS-PAGE de uma curva de calibração de BSA (0,2 mg/mL), nas concentrações de 0,6; 1; 2 e 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, foi utilizado como banda padrão para quantificação das bandas da amostra no software.

4.4.5 Caracterização das nano e micropartículas funcionalizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e de Varredura (MEV)

A caracterização morfológica das nanopartículas funcionalizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada em parceria com o Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná, em parceria com o prof. Dr. Guilherme Picheth e a Dr^a Isabela Dias. O microscópio utilizado para as análises de MET foi o microscópio eletrônico JEOL JEM 1400EX-II, nas ampliações de 2, 5, 10, 20 e 120 kx. O microscópio utilizado para as análises de MEV foi o microscópio eletrônico JSM 6360-LV (Jeol, MA, EUA) operando a 3 kV, nas ampliações de 1, 5, 20 e 50 kx.

Para as análises de MET, todas as suspensões de nanopartículas funcionalizadas nas mesmas condições foram diluídas na concentração final de $0,1 \text{ mg/mL}^{-1}$ em água ultrapura. Uma gota de $5 \text{ }\mu\text{L}$ foi depositada em uma grade de 200 malhas revestidas com carbono com descarga luminosa. A coloração negativa foi realizada usando ácido fosfotungstico a 2% (p/v). Amostras de nanopartículas também foram preparadas com solução de octanoato de estanho 2% (p/v) a fim de prover contraste negativo do interior da amostra. Todas as imagens foram adquiridas com a câmera Orius (Gatan Inc., MA, EUA).

Para as análises de MEV, as amostras de nanopartículas controle e funcionalizadas em suas concentrações de saturação foram depositadas em uma fita dupla-face condutora de carbono e secos à temperatura ambiente. Em seguida, foram revestidas com uma camada de paládio-platina de cerca de 3 nm usando um *Cressington* revestidor por pulverização catódica 208HR, com estágio de inclinação planetária rotativa, equipado com um controlador de espessura MTM-20.

4.4.6 Caracterização das micropartículas funcionalizadas por Microscopia Confocal

A caracterização morfológica das micropartículas funcionalizadas por microscopia confocal foi realizada em parceria com o Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) da Universidade Federal do Paraná (CTAF-UFPR), utilizando o microscópio multifotônico confocal de varredura a laser A1R MP + Nikon de alta resolução, nas ampliações 20, 60 e 100x.

Para confecção das lâminas, uma solução de $40 \text{ }\mu\text{g}$ de cada proteína analisada, estáveis em buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) e NaCl 150 mM, foi misturada em $10 \text{ }\mu\text{L}$ de micropartícula de PHB (concentração final de $2,5 \text{ }\mu\text{g/}\mu\text{L}$). A reação de imobilização foi incubada a temperatura ambiente ($20\text{-}30^\circ \text{ C}$) overnight em 120 rpm. Após a incubação, foi realizado 3 etapas de lavagem com o buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) e NaCl 150 mM no volume de $100 \text{ }\mu\text{L}$. Ao final de cada lavagem, os *pellets* fluorescentes foram monitorados utilizando o transluminador em tempo real E-gel (Invitrogen). O *pellet* foi ressuspensão em $15 \text{ }\mu\text{L}$ de glicerol 100% não estéril e a solução foi aplicada em lâminas de microscopia para posterior etapa de secagem em estufa 37°C por 2h. As lâminas secas e vedadas foram analisadas no microscópio confocal. As imagens foram coletadas através do software Nis Elements 4.20 (Nikon, Japão) a

cada 0,5 μm ao longo do eixo z. As medidas processadas no software ImageJ v1.51n foram realizadas no plano equatorial de cada cápsula para minimizar o erro devido à posição do corte.

4.4.7 Caracterização das nanopartículas funcionalizadas por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica acoplada à espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi empregada neste estudo para caracterizar morfológica e topograficamente as nanopartículas de PHB funcionalizadas com as proteínas fluorescentes. As amostras preparadas no laboratório do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) foram enviadas ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM – Campinas, SP) para a realização das análises. As análises topográficas foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) por técnico qualificado em um microscópio de força atômica Multimode8 (Bruker™) no modo de força de pico. Uma sonda SCANASYST-AIR (Bruker™) com constante de mola de $0,4 \text{ N.m}^{-1}$ e raio de ponta de 2.0 nm foi utilizada para a varredura.

Para a preparação das amostras, 3 lâminas foram preparadas utilizando 30 μg de proteína de interesse e 50 μL de nanopartícula de PHB (2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em um volume final de reação de 200 μL . Após a imobilização a temperatura ambiente (20-30° C), overnight em 120 rpm, as reações foram transferidas para uma membrana de diálise com cut off de 14 kDa e dialisadas contra 2 L de água MiliQ autoclavada, por 16h, em agitador magnético, a temperatura ambiente para remoção do NaCl do buffer. As amostras ressuspensas foram depositadas sobre substrato de mica e o material foi seco sob fluxo suave de N_2 por 3h. A plataforma AFM foi montada em uma câmara ambiental, que permite o controle da umidade relativa e da temperatura (10% e 25 °C). A lâmina controle foi preparada utilizando apenas 50 μm de nanopartícula de PHB sem proteína.

4.4.8 Análise por Superfície de Ressonância Plasmônica (SPR) das nanopartículas funcionalizadas

Para estimar a intensidade de afinidade de interação entre as diferentes *tags* com uma superfície de PHB, foram realizados ensaios com a técnica de SPR em um filme de PHB

recobrando o sensor. A interação entre as proteínas com a superfície de PHB foi analisada utilizando interfaces 2D poliméricas. Para tal, foi depositada 100 μL de uma solução de PHB, solubilizado em TFE, a uma concentração final de 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sobre os sensores revestidos com ouro (BioNavis, Finlândia) overnight. Em seguida, soluções de diferentes concentrações de cada proteína foram aplicadas a 20 $\mu\text{L}/5$ min. A obtenção dos resultados e o ensaio foram feitos em parceria com a Dr^a Isabela Dias e o prof. Dr. Guilherme Picheth.

4.4.9 Análise por Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) das nanopartículas funcionalizadas de sfGFP-SBD

O ensaio de Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) para a proteína sfGFP-SBD foram úteis para avaliar sua característica de agregação. As medidas de SAXS foram realizadas na linha Cateretê do Sírius (LNLS, Campinas, Brasil). As medições SAXS foram registradas usando o detector Pilatus 300 k. A distância da amostra ao detector foi ajustada para 900 mm e o comprimento de onda (k) foi ajustado para 1,54 Å. A calibração foi realizada usando padrão de behenato de prata ($d_{\text{AgBe}} = 58,38$ Å). As amostras foram carregadas em capilares de quartzo de 1,5 mm de diâmetro, que foram colocados no estágio de aquecimento Linkam THMS600 e equilibrados na temperatura inicial. O ensaio foi realizado em parceria com o prof. Dr. Guilherme Picheth.

4.4.10 Análise de dessorção das proteínas nas nanopartículas

Para estimar a estabilidade da interação entre as diferentes *tags* das proteínas fluorescentes com o PHB, foi realizado um ensaio utilizando um gradiente de detergente neutro (Triton X-100), em diferentes concentrações, e estimando o potencial de dessorção através da fluorescência das proteínas no sobrenadante (frações desligadas/FDL).

Neste ensaio, após determinar o ponto de saturação de cada proteína no item 4.4.3, foi misturado 8 μL de NP (0,02 mg/mL^{-1}) com as proteínas na concentração de saturação, conforme a metodologia de imobilização já descrita anteriormente (item 4.4.3). Após as etapas de lavagem e medição da fluorescência das FNL, o *pellet* foi ressuspensão em buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM e Triton-X100 0,1%, centrifugado em minispin a 15.000 rpm por 2 minutos. A fração desligada (FDL) ou sobrenadante foi transferida em novo microtubo

identificado e 100 μ L foi aplicado em microplaca preta de 96 poços para medição da intensidade de fluorescência em comprimento de onda adequado para GFP (item 4.3.4).

O *pellet* foi então ressuspenso em um novo buffer com concentração de Triton X-100 de 0,5%, centrifugado e a fluorescência do sobrenadante analisada. Essa etapa foi repetida mais 4 vezes, seguindo o gradiente de concentração do detergente em 1%, 2%, 4% e 6%.

Todas as FDL foram analisadas e comparadas com a intensidade de fluorescência controle/inicial e das FNL. O teste foi realizado em triplicata e o programa para o tratamento dos dados e composição do gráfico foi realizado em Excel 2019 e Prisma GraphPad (versão 9.0), respectivamente.

4.5 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

4.5.1 Previsão estrutural de proteínas recombinantes utilizando o software RoseTTA Fold

O software RoseTTA Fold é um programa de inteligência artificial desenvolvido em 2021 por Baek e colaboradores que realiza a previsão estrutural de proteínas a partir de uma sequência de entrada utilizando a técnica de *Machine Learning*. Basicamente o software utiliza 3 redes ou camadas neurais para processar as informações de alinhamento da sequência de entrada, distância e coordenadas, de modo simultâneo. A sequência de entrada foi submetida no formato FASTA no próprio servidor e os resultados da modelagem apresentam consigo a acurácia do processo. Este software está disponível gratuitamente sob cadastro prévio no servidor Robetta (<https://robetta.bakerlab.org/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Superexpressão e purificação da proteína sfGFP

Para determinar a melhor condição em que a proteína sfGFP é expressa, foi primeiramente realizado um teste de expressão, cuja metodologia foi detalhada no item 4.3.1. O plasmídeo pSB1A2-sfGFP (Tabela 4, item 4.2.1) foi utilizado para expressar a proteína sfGFP em *E. coli* Top10 na ausência de um indutor no meio, uma vez que o promotor deste plasmídeo é constitutivo (J23104). Para obtenção do plasmídeo, foi realizada uma

minipreparação de DNA plasmidial (item 4.2.2) a partir de cepas de *E. coli* Top10 transformadas e armazenadas em estoque em glicerol a -20°C (item 4.1.2). Uma análise prévia da integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada (item 4.2.4). Após a confirmação de viabilidade do vetor, a miniprep foi utilizada para transformar uma nova alíquota de *E. coli* Top10 competente e obter colônias frescas e isoladas que foram utilizadas para expressão.

Para expressão do gene no plasmídeo recombinante, 3 colônias isoladas dessa cepa recombinante em placa contendo LA foram inoculadas em 10 mL de meio LB e antibiótico apropriado (detalhado no item 4.1.2, tabela 3) para os testes de expressão. As frações bruta, solúvel e insolúvel após a lise por sonicação e etapas de centrifugação foram analisadas por SDS-PAGE. A Figura 11 ilustra um gel de poliacrilamida 12% de SDS-PAGE utilizado para identificar a melhor condição em que essa proteína é expressa em *E. coli* Top10. Nota-se que a proteína se mostrou expressa no tamanho esperado (indicado pela seta branca), de 26,6 kDa, na ausência de indutor, sem truncamento e solúvel na condição de 30°C , 120 rpm por 16h. Este resultado corrobora o obtido no estudo de Coolbaugh, Shakalli e Madeira (2017) para a proteína sfGFP nas mesmas condições.

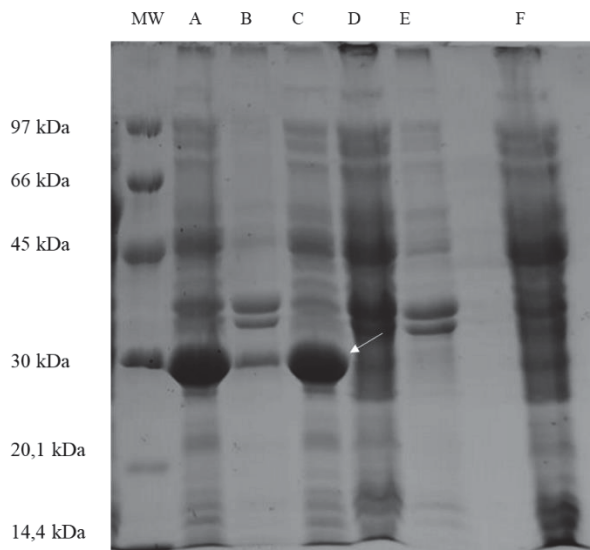


Figura 11. Gel de SDS-PAGE do teste de expressão da proteína sfGFP. A proteína sfGFP (26,6 kDa) foi expressa a partir do plasmídeo pSB1A2-sfGFP em *E. coli* Top10 a 30°C , 120 rpm por 16 h, na ausência de um indutor. A seta branca indica a banda correspondente ao tamanho esperado da proteína expressa nessas condições. Legenda: MW = marcador molecular; as colunas A, B e C representam os extratos bruto, insolúvel e solúvel da expressão por *E. coli* Top10 contendo o plasmídeo pSB1A2-sfGFP, respectivamente. As colunas D, E e F correspondem, respectivamente, aos extratos bruto, insolúvel e solúvel de *E. coli* Top10 contendo o plasmídeo pSB1A2 vazio (controle).

Após determinar a melhor condição de expressão de sfGFP, a próxima etapa foi purificá-la. Sendo assim, a proteína foi expressa sob as mesmas condições em 200 mL de cultura. Sendo assim, 50 mL dessa cultura foi utilizado para lisar e purificar o extrato solúvel, conforme indicou a metodologia no item 4.3.6. Entretanto, devido à ausência da 6His-tag nessa proteína, que facilitaria sua purificação por cromatografia de afinidade, optou-se por realizar um teste prévio de precipitação da proteína com gradiente de sulfato de amônio sólido (*salting out*), seguindo a metodologia de Scoopes (1994).

Nessa abordagem, o aumento de força iônica em uma solução de proteínas favorece as interações do eletrólito com as moléculas de água (solvatação) e reduz as interações da proteína com a solução, favorecendo interações proteína-proteína e levando, assim, à formação de um agregado proteico, que pode ser separado do restante das demais proteína ainda solúveis em solução por técnicas de centrifugação (WINGFIELD, 2001). Ressalta-se também que cada proteína precipita em faixa específica de saturação da solução pelo eletrólito.

Por essa razão, neste primeiro teste prévio para determinar qual porcentagem de saturação em que sfGFP precipita na presença de sulfato de amônio, 5 mL de extrato solúvel foram submetidos a um *range* de 20 a 70% de saturação com o sal, em 5 intervalos contínuos de 10 %, conforme descrito na metodologia do item 4.3.7. A análise das frações precipitadas ao final de cada faixa de saturação, bem como seus sobrenadantes, foi realizada por SDS-PAGE. A figura à esquerda da Figura 12 mostra o resultado em gel de SDS-PAGE desse primeiro teste de purificação.

Nem a sfGFP nem as proteínas contaminantes precipitaram com 20% de saturação (lane A). Após aplicar a quantidade necessária para saturar a solução de proteína em 30% e separar as frações *pellet* e sobrenadante dessa faixa (20-30%), percebe-se, pela intensidade da banda correspondente à proteína no gel, que a sfGFP não precipitou em 30% (lane B), mas permaneceu solúvel junto com as demais proteínas no sobrenadante (lane C). Esse resultado indica que a sfGFP deve saturar em 40% de sulfato de amônio ou mais. Os demais intervalos não detectaram a proteína precipitada em nenhuma outra concentração de faixa testada, a não ser nos sobrenadantes de 50% (lane H), 60% (lane K) e na última faixa testada (60-70%), como visualizado nas lanes L, M e N.

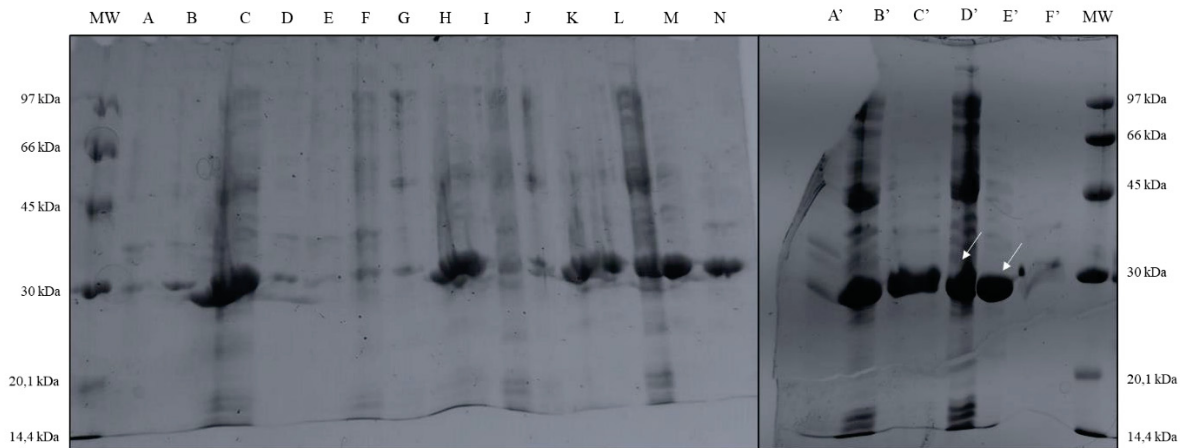


Figura 12. Gel de SDS-PAGE da purificação de sfGFP testando condições para purificação proteica por *salting out*. À esquerda, 5 mL de fração solúvel de sfGFP (26,6 kDa) foram purificadas por um gradiente de 20 a 70% de sulfato de amônio, com intervalos de 10%. Legenda: MW = marcador molecular; lanes A, B e C correspondem às frações pellet 20%, pellet 30% e sobrenadante 30%, respectivamente, do intervalo 20-30%. Lanes D e E = frações pellet 30% e pellet 40% respectivamente, do intervalo 30-40%. Lanes F, G e H = frações pellet 40%, pellet 50% e sobrenadante 50% respectivamente, na faixa 40-50%. Lanes I, J e K = pellet 50%, pellet 60% e sobrenadante 60%, na faixa 50-60%. Lanes L, M e N = pellet 60%, pellet 70% e sobrenadante 70%. À direita, o segundo teste de saturação para determinar qual melhor faixa de rendimento entre 30-40% e 60-70%. Lanes A', B' e C' = pellet 30%, pellet 40% e sobrenadante 40%; lanes D', E' e F' = pellet 60%, pellet 70% e sobrenadante 70%.

No estudo de Deschamps, Miller e Ward (1995), a faixa de saturação de sulfato de amônio utilizada para purificar GFP foi de 40-70%. No estudo em questão, uma fração da GFP é precipitada em 40%, mas a maior quantidade permanecia solúvel no sobrenadante de 40%, a qual foi posteriormente precipitada em sua totalidade em 70% de saturação. Comparando este resultado aos resultados prévios obtidos com o primeiro teste de precipitação de sfGFP, observa-se que uma fração de sfGFP permanece na fração solúvel (sobrenadante) de 30% (lane C) e outra fração é precipitada no intervalo de 60-70% (lanes L, M e N), o que vai ao encontro dos resultados obtidos no estudo de Deschamps et al. (1995).

Dessa forma, após determinar as duas melhores condições de precipitação (30-40 e 60-70%), foi realizado um novo teste para verificar a melhor condição das duas faixas selecionadas. O gel de SDS-PAGE das frações deste segundo teste também pode ser visualizado na Figura 12, ao lado direito. As setas brancas indicam que a melhor condição para precipitar a sfGFP com sulfato de amônio é a faixa de 60-70%. Neste segundo ensaio, pode-se perceber que com 60% de saturação de sulfato de amônio, a maioria das proteínas contaminantes do extrato solúvel já são precipitadas (lane D'), incluindo uma pequena fração que corresponde à proteína de interesse. Entretanto, a maior parte da proteína sfGFP ainda é precipitada quando o sobrenadante da fração de 60% é utilizado para atingir 70% de saturação, onde nota-se que majoritariamente a sfGFP é precipitada (lane E'), com raros contaminantes presentes.

Analisando se ainda há sfGFP solúvel no sobrenadante após atingir 70% de saturação (lane F'), não há proteína detectável.

Assim, conclui-se que a fração precipitada de 70% contém a maior fração purificada de sfGFP, a qual foi utilizada para os próximos experimentos. Esse resultado concorda com a estratégia elaborada de Pe' delacq et al. (2006) ao precipitar sfGFP com sulfato de amônio com saturação de 80%.

Para remover o sulfato de amônio (70%) presente na fração precipitada de sfGFP, o *pellet* da proteína foi ressuspensa em seu buffer de estabilidade (TrisHCl 50 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM) e 1 mL foi aplicado a uma coluna de exclusão molecular (Sephadex G50), no fluxo 1 mL/min. O resultado desse *dessalting* pode ser visto no gel de SDS-PAGE de análise de pureza das frações (figura 13).

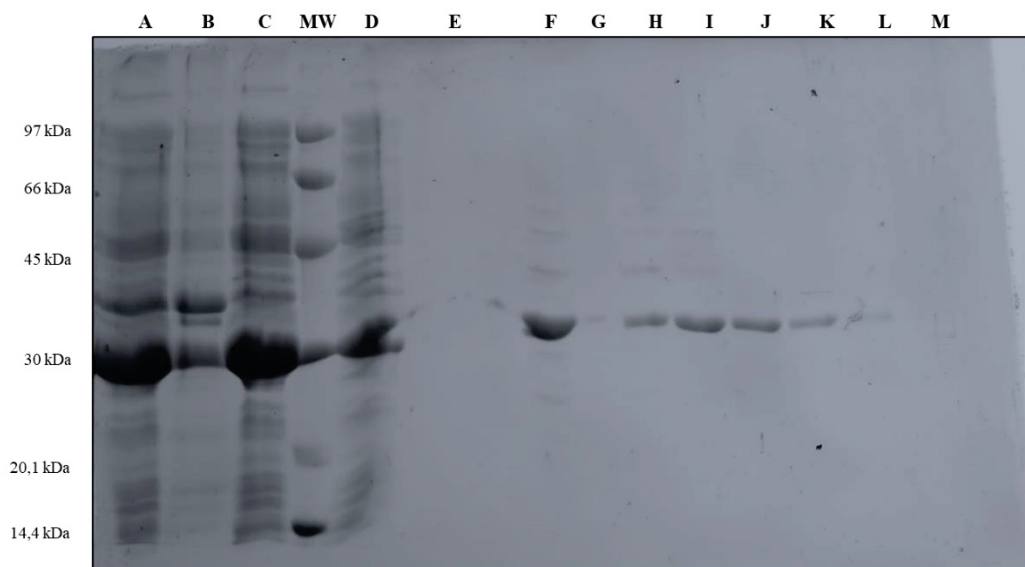


Figura 13. SDS-PAGE de frações de todos os estágios da purificação de sfGFP. A figura mostra as frações bruta (A), insolúvel (B) e solúvel (C) de sfGFP, bem como a fração solúvel precipitada com 60% de sulfato de amônio (D), sobrenadante após 70% (E), a fração precipitada com 70% antes de SEC (F), a fração lavada na coluna Sephadex G50 (G) e as frações de eluição da proteína após aplicar na coluna de exclusão molecular/SEC (H, I, J, K, L e M).

Para avaliar o grau de pureza das frações da purificação da sfGFP foi realizado uma tabela de purificação (Tabela 5).

Tabela 5. Purificação de sfGFP

Estapas da purificação	Peso seco (g)	Volume (mL)	Proteína total (mg) a	Fluorescência total (RFU) b	Fluorescência específica (RFU/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato Bruto	0,275	50	92,25	22.755.500	246672,1	100	1
Extrato Solúvel	0,005	5	9,12	2.296.017	251756,2	10,090	1,02
<i>Salting out</i> (S.A. - 70%)	0,005	5	4,83	911.017	188616,3	4,004	0,76
Sephadex G50	0,001	1	1,8	104.590	58105,6	0,460	0,24

a Determinada por ensaio colorimétrico de Bradford (BSA como padrão)

b Determinada por ensaio fluorimétrico (Auto Gain 27)

Analisando a tabela, a estratégia utilizada por precipitação de sulfato de amônio a 70% foi razoavelmente vantajosa na etapa de eliminação das contaminantes, uma vez que a quantidade total de proteína do extrato solúvel para o extrato precipitado diminuiu, bem como a fluorescência total. Entretanto, o valor de fluorescência específica e o fator de purificação, os quais são parâmetros mais sensíveis para estimar a presença da proteína de interesse, pouco variaram em detrimento dos demais parâmetros.

Já na fase de *dessalting*, utilizada para remover o sulfato de amônio a 70%, tanto o índice de purificação quanto rendimento e atividade específica diminuíram consideravelmente. Uma estratégia possivelmente vantajosa poderia ser a utilização da cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), já explorada por outros autores (DONG; DING; WANG, 2019) para purificar GFP e variantes, uma vez que a estrutura da proteína é beneficiada pelo somatório de interações hidrofóbicas entre os resíduos que compõem o barril- β . Além disso, a própria remoção do sal ao longo desse tipo de cromatografia evitaria o decaimento do rendimento na etapa final do processo e eliminaria resquícios de contaminantes que ficaram diluídas na estratégia utilizada com SEC.

Após a etapa de SEC, as concentrações das alíquotas de sfGFP foram determinadas por ensaio colorimétrico de Bradford, conforme relatado no item 4.3.4. A concentração final de sfGFP disponível para os ensaios foi estimada em 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.2 Superexpressão e purificação da proteína sfGFP-SBD

Para determinar a melhor condição de solubilidade e integridade em que sfGFP-SBD é expressa, foi primeiramente realizado um teste de expressão, cuja metodologia foi detalhada no item 4.3.1. O plasmídeo pET28a-sfGFP-SBD (Tabela 4, item 4.2.1) foi utilizado para superexpressar a proteína sfGFP-SBD em *E. coli* BL21 (DE3) na presença de 0,5 mM do indutor IPTG presente no meio, uma vez que sua transcrição é regida pelo seu promotor T7 do pET28. Inicialmente, a viabilidade da miniprep desse plasmídeo foi analisada por eletroforese

de DNA em gel de agarose e transformada em *E. coli* BL21 (DE3). Para superexpressar essa proteína, 3 colônias isoladas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas em LA foram inoculadas em 10 mL de meio LB e antibiótico apropriado (item 4.1.2, Tabela 3) para os testes de expressão. As frações bruta, solúvel e insolúvel após a lise e centrifugação foram analisadas por SDS-PAGE, como demonstrado na figura 14.

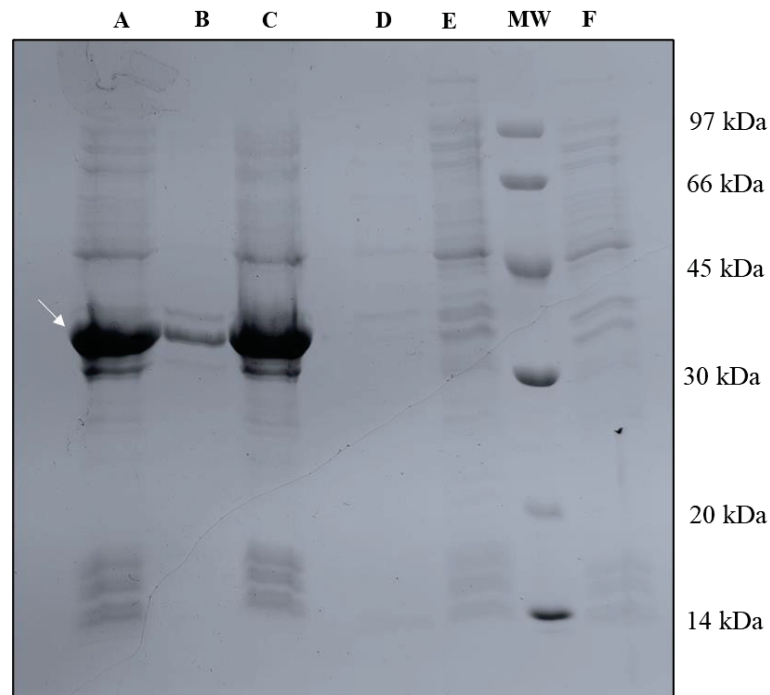


Figura 14. Gel de SDS-PAGE do teste de expressão da proteína sfGFP-SBD. A proteína sfGFP-SBD (33,6 kDa) foi expressa a partir do plasmídeo pET28a-sfGFP-SBD em *E. coli* BL21 (DE3) a 37° C, 120 rpm por 4h, na presença de 0,5 mM de IPTG. A seta branca indica a banda correspondente ao tamanho esperado da proteína superexpressa nessas condições. Legenda: MW = marcador molecular; as colunas A, B e C representam os extratos solúvel, insolúvel e bruto de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pET28a-sfGFP-SBD, respectivamente. As colunas D, E e F correspondem, respectivamente, aos extratos insolúvel, solúvel e bruto de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pET28a vazio (controle).

Na condição testada, a sfGFP-SBD foi melhor superexpressa sob 37° C, a 120 rpm por 4h, na presença de 0,5 mM de indutor (IPTG, 1M). Nessa condição, a proteína foi superexpressa no tamanho esperado de 33,6 kDa (seta branca), de forma íntegra e majoritariamente solúvel. Esse resultado confirmou o resultado esperado, no qual se baseou no estudo de Park et al. 2005 para a expressão da proteína EGFP-SBD, que utilizou as mesmas cepas e condições de expressão e apresentou um rendimento de 0,3 µg/mL.

Uma vez que o teste de expressão indicou boa solubilidade da proteína, a sfGFP-SBD foi superexpressa nas mesmas condições em 200 mL de meio LB. 50 mL de cultura foram utilizados para lisar por sonicação e 5 mL do seu extrato solúvel foi purificado por

cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC), utilizando a coluna HiTrap Chelating (5 mL) carregada com solução de NiCl_2 100 mM, uma vez que esta proteína possui cauda 6His C-terminal. A Figura 15 mostra o perfil de eluição de sfGFP-SBD da coluna através de um gradiente de imidazol (50 a 300 mM).

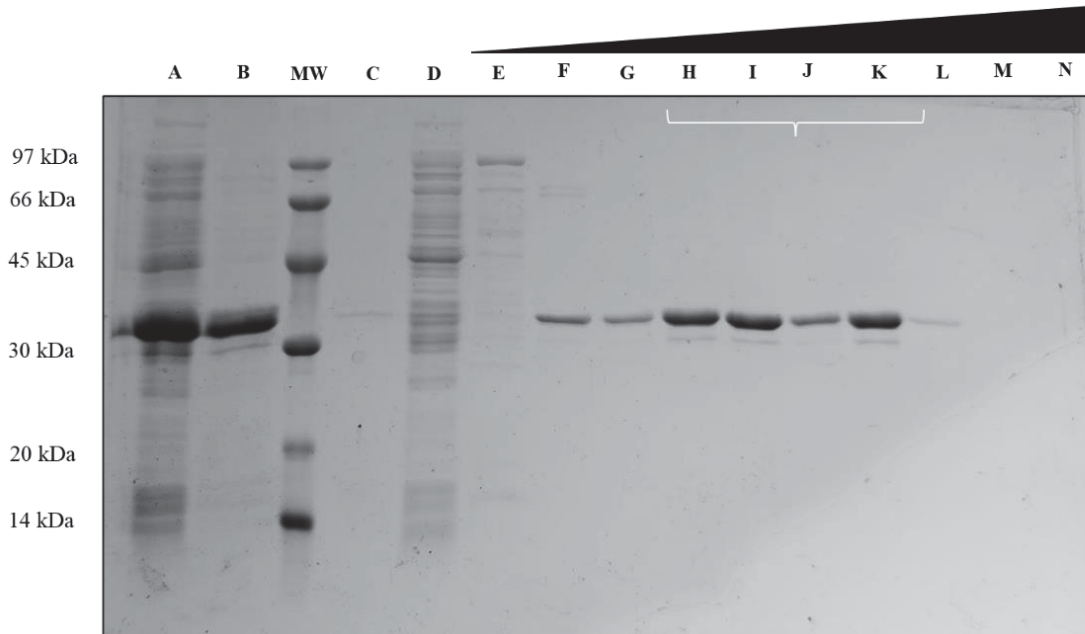


Figura 15. Gel de SDS-PAGE da purificação de sfGFP-SBD. A figura mostra as frações solúvel (A) e insolúvel (B) antes de ser inseridas na coluna. O marcador molecular (MW), fração de lavagem (C), a fração não ligada à coluna de Ni^{2+} (D) e o gradiente de imidazol (E-N). O gradiente de imidazol (triângulo preto superior) foi utilizado na faixa de 50 mM (E), 100 mM (F e G), 150 mM (H e I), 200 mM (J e K), 250 mM (L), 300 mM (M) e 1M (N). As frações de 150 e 200 mM foram utilizadas para a diálise, identificação e dosagem por Bradford, como indicado pela chave branca superior.

A análise de SDS-PAGE das frações indica que sfGFP-SBD eluiu da coluna na faixa de 100 a 200 mM de imidazol e nenhuma fração dessa proteína eluiu nas frações não ligada ou de lavagem. Na faixa específica de 150 a 200 mM, a proteína eluiu em maior quantidade, apresentando pureza e ausência de contaminantes em todas as faixas eluídas. Por essa razão, essas frações foram juntadas e dialisadas para remover a concentração de imidazol das amostras, conforme relatado no item 4.3.8. Após a diálise, a concentração das frações purificadas da proteína foi determinada por ensaio colorimétrico de Bradford, utilizando gradiente de concentração conhecida de BSA como curva padrão no programa Excel. A concentração final de sfGFP-SBD foi de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Em paralelo à diálise, as bandas correspondentes à proteína nas frações eluídas de 150 mM de imidazol foram recortadas do gel para serem identificadas por espectroscopia de massas (MALDI-TOF), como descrito no item 4.3.9. Os espectrogramas de picos e a lista de peptídeos

identificada obtidos da análise por MALDI-TOF para identificação da proteína foram comparados com a lista teórica de carga/massa (z/m) obtida pela sequência primária da proteína tripsinizada *in silico* pelo software *Expasy PeptideMass*.

O índice de cobertura calculado utilizando a comparação de *match* de peptídeos esperados e observados para sfGFP-SBD foi de 38%, o que revela a identidade da proteína esperada, uma vez que essa porcentagem provém de uma proteína quimérica, na qual apenas a sequência primária dessa proteína serve como o próprio banco de dados. O espectrograma, bem como a lista de carga/massa (z/m) de peptídeos obtidas e esperadas, pode ser consultada no Anexo dessa dissertação.

5.3 Superexpressão e purificação das variantes SBD

Para superexpressar as variantes de SBD, tanto as minipreps dos plasmídeos pET29b-sfGFP-sSBD e pET29b-sfGFP-sSBDA quanto suas restrições com as endonucleases XhoI e NdeI (item 4.2.5), foram confirmadas por eletroforese de DNA em gel de agarose 1% (item 4.2.4). Após a confirmação dos plasmídeos, os vetores foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3) competentes (item 4.2.3) e as colônias foram submetidas a um teste de expressão para verificar a funcionalidade e solubilidade das variantes. O teste de expressão foi realizado conforme metodologia indicada no item 4.3.1

No estudo de Park et. (2005), citado anteriormente, e de Sharma et al. (2019), a superexpressão de EFGP-SBD e sfGFP, respectivamente, foram realizadas sob às mesmas condições de expressão, ditas como 37° C, 200 rpm e 4h. O resultado demonstrou bons rendimentos e boa solubilidade de ambas. Entretanto, sabe-se que proteínas recombinantes apresentam um bom dobramento e, portanto, melhor solubilidade, quando submetidas a temperaturas menores e períodos mais prolongados de exposição ao indutor (JOSEPH et al., 2015; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Neste sentido, optou-se por adaptar as condições de expressão utilizadas nos trabalhos de Park (2005) e Sharma (2019) para 20° C, 120 rpm, overnight, variando a concentração de IPTG (1M) em 0,5 e 1 mM. As frações bruta, solúvel e insolúvel após a lise e centrifugação de cada proteína foram analisadas por SDS-PAGE, conforme demonstra a Figura 16.

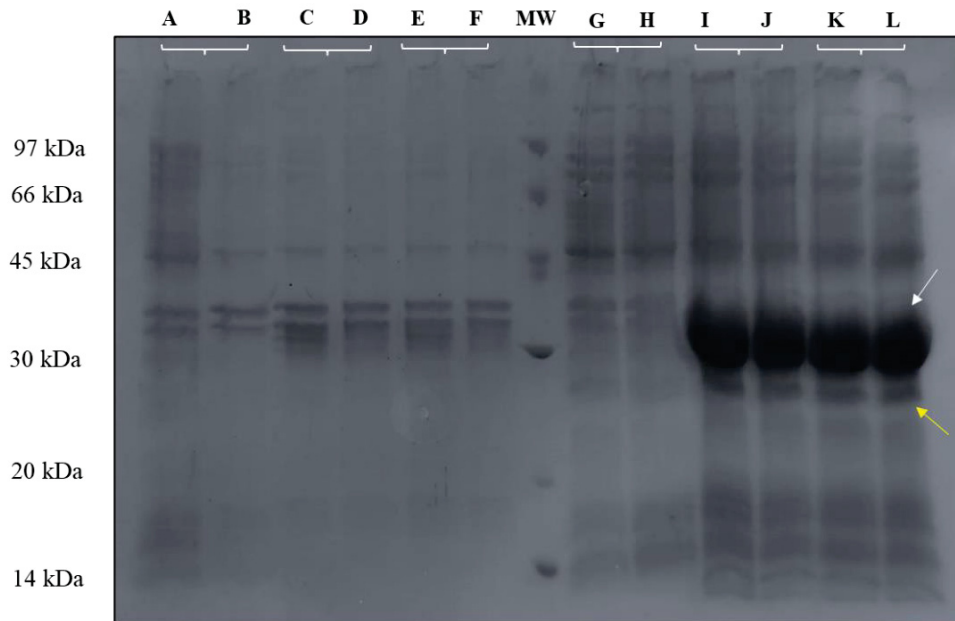


Figura 16. Gel de SDS-PAGE do teste de expressão das proteínas sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA. As proteínas sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA (33,2 kDa) foram superexpressas a partir dos plasmídeos pET29b-sfGFP-sSBD e pET29b-sfGFP-sSBDA, respectivamente, em *E. coli* BL21 (DE3) a 20° C, 120 rpm overnight, na presença de 0,5 e 1 mM de IPTG. A seta branca indica a banda correspondente ao tamanho esperado das proteínas superexpressas nessas condições e a seta amarela indica a superexpressão de uma proteína contaminante, com peso molecular aproximado de 30 kDa. Legenda: as lanes A-B, C-D e E-F pertencem às frações insolúveis de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor pET29b vazio (controle) quando aplicado 0,5 e 1 mM de IPTG; *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor pET29b-sfGFP-sSBD em 0,5 e 1 mM de IPTG no meio e *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor pET29b-sfGFP-sSBDA em 0,5 e 1 mM de IPTG no meio, respectivamente. MW representa o marcador molecular e as lanes G-H, I-J e K-L são referentes às frações solúveis de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor pET29b vazio (controle) quando aplicado 0,5 e 1 mM de IPTG; *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor pET29b-sfGFP-sSBD em 0,5 e 1 mM de IPTG no meio e *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor pET29b-sfGFP-sSBDA em 0,5 e 1 mM de IPTG no meio, respectivamente.

No gel de SDS-PAGE, nota-se que ambas as variantes foram superexpressas na condição testada (20° C overnight, 120 rpm), apresentando tamanho esperado (33,2 kDa). Percebe-se a proporção da proteína superexpressa nas duas frações (solúvel e insolúvel), indicando que a diminuição da temperatura e a extensão do tempo de indução, de fato, favoreceram uma boa solubilidade das duas proteínas. Percebe-se também que não houve diferença significativa em relação à quantidade de indutor (0,5 mM ou 1 mM de IPTG) aplicado no meio de cultura durante a expressão de ambas as proteínas. Entretanto, quanto à integridade, pode-se notar que, em ambas as proteínas (sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA), uma banda de aproximadamente 30 kDa, indicado pela seta amarela, é expressa junto com as proteínas de interesse nas frações solúveis (lanes I, J, K e L).

Uma vez que o teste de expressão concluiu uma boa solubilidade das proteínas, ambas as variantes foram superexpressas nas mesmas condições em 200 mL de meio LB. 50 mL das

culturas foram utilizadas para lise por sonicação e 5 mL do seu extrato solúvel foi purificado por cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC), utilizando a coluna HiTrap Chelating (5 mL) carregada com solução de NiCl_2 100 mM, uma vez que estas proteínas também possuem cauda 6His C-terminal. As Figuras 17 e 18 mostram o perfil de eluição de sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA, respectivamente, da coluna através de um gradiente de imidazol (50 a 300 mM).

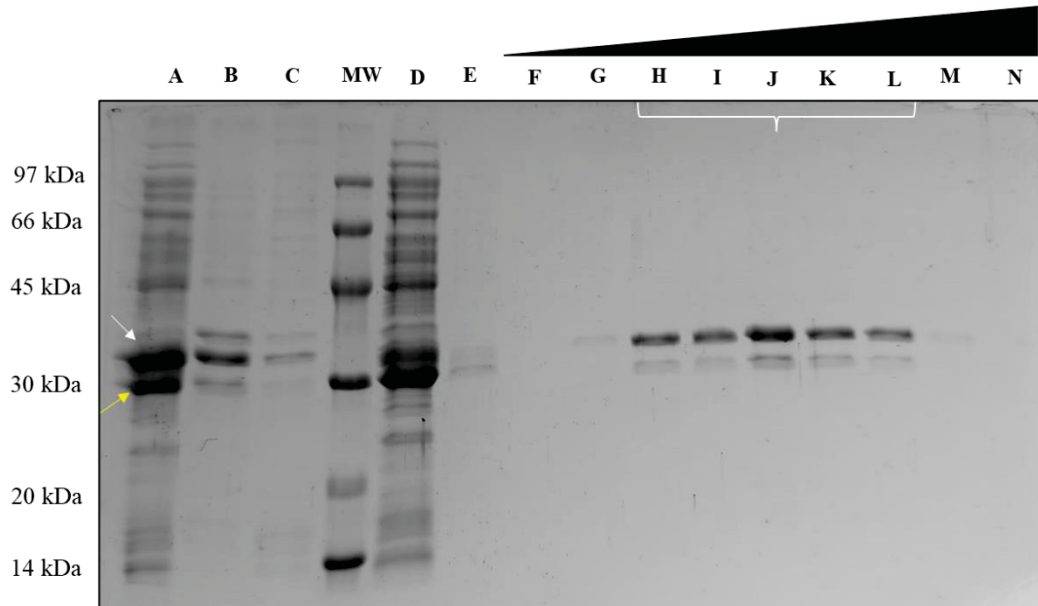


Figura 17. Gel de SDS-PAGE da purificação de sfGFP-sSBD. A figura mostra as frações solúvel (A) e insolúvel (B) antes de ser inseridas na coluna. O marcador molecular (MW), a fração não ligada à coluna de Ni^{2+} (C), frações de lavagem (D e E) e o gradiente de imidazol (F-N). O gradiente de imidazol (triângulo preto superior) foi utilizado na faixa de 50 mM (F), 100 mM (G), 150 mM (H e I), 200 mM (J e K), 250 mM (L), 300 mM (M) e 1M (N). As frações de 150, 200 e 250 mM foram utilizadas para a diálise, identificação por MALDI-TOF e dosagem por Bradford, como indicado pela chave branca superior. A seta branca corresponde ao tamanho esperado de sfGFP-sSBD (33,2 kDa), enquanto a seta amarela representa uma proteína contaminante de ~30 kDa.

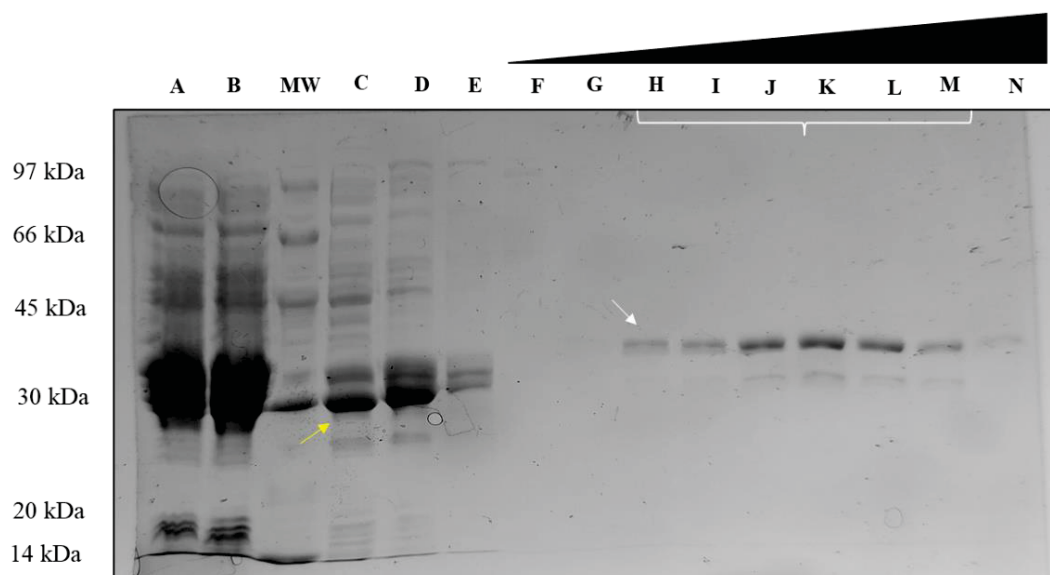


Figura 18. Gel de SDS-PAGE da purificação de sfGFP-sSBDA. A figura mostra as frações solúvel (A) e insolúvel (B) antes de ser inseridas na coluna. O marcador molecular (MW), a fração não ligada à coluna de Ni²⁺ (C), frações de lavagem (D e E) e o gradiente de imidazol (F-N). O gradiente de imidazol (triângulo preto superior) foi utilizado na faixa de 50 mM (F), 100 mM (G), 150 mM (H e I), 200 mM (J, K e L) e 250 mM (M e N). As frações de 150, 200 e 250 mM foram utilizadas para a diálise, identificação e dosagem por Bradford, como indicado pela chave branca superior. A seta branca corresponde ao tamanho esperado de sfGFP-sSBDA (33,2 kDa), enquanto a seta amarela representa uma proteína contaminante de ~30 kDa.

A análise de SDS-PAGE das frações indica que ambas as variantes eluíram da coluna na faixa de 150 a 250 mM de imidazol. As nanopartículas dessa faixa (indicadas pela chave branca nas figuras) foram as frações eluídas de ambas as proteínas utilizadas para a remoção de imidazol por diálise, conforme o item 4.3.8. As frações dialisadas foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford e suas concentrações finais disponíveis para uso foi de 0,2 µg/µL para sfGFP-sSBD e 0,17 µg/µL para sfGFP-sSBDA.

Entretanto, percebeu-se que a banda contaminante de 30 kDa foi expressa novamente em ambas as proteínas após expressão em 200 mL. Nota-se também que a proporção da banda de interesse (33,2 kDa) e da banda contaminante (~30 kDa) no gel é de aproximadamente 50% nas frações solúveis (lanes A e B, seta amarela), especialmente para a proteína sfGFP-sSBD (figura 17).

A proteína de 30 kDa elui majoritariamente já na fração de lavagem (lane D, figura 17) de sfGFP-sSBD e nas frações não ligada e de lavagem (lanes C, D e E, figura 17) de sfGFP-sSBDA, embora seja eluída novamente em conjunto com as proteínas de interesse (banda de 33,2 kDa) nas frações de 150 a 200 mM de imidazol, em menor quantidade. Esse resultado indica que a proteína aqui chamada de contaminante para as frações de interesse eluídas no gradiente de imidazol (30 kDa) não apresenta afinidade pela coluna carregada por Ni²⁺. Essa baixa afinidade ao níquel pode indicar um truncamento das proteínas de interesse, especificamente na porção C-terminal onde se encontra a cauda 6His, durante o processo de tradução das proteínas na presença do indutor, uma vez que essa situação se estende desde a etapa de teste de expressão.

Adicionalmente, percebe-se que a proteína contaminante de 30 kDa se apresenta funcional, tanto na emissão de luz fluorescente quanto na capacidade de se ligar no PHB, como será visualizado nos resultados apontados do item 5.6. As análises de espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) das bandas de 33 kDa e 30 kDa de sfGFP-sSBD foram retiradas do gel, descoradas e analisadas conforme metodologia 4.3.9. Os espectrogramas de massa/carga (m/z) mais abundantes obtidos pela análise das bandas (disponíveis na secção Anexo) indicou que

houve um truncamento da proteína durante o processo de tradução dela, uma vez que os picos de peptídeos referentes ao barril- β de sfGFP são semelhantes, mas os picos de peptídeos que correspondem à sequência mais C-terminal da proteína, apesar de serem semelhantes, são mais abundantes e de tamanhos menores para a banda contaminante (30 kDa) do que para banda de interesse (sfGFP-sSBD), indicando que nessa região do espectro houve degradação. Ressalta-se também que durante o processo de eluição, as frações de lavagem (contendo a proteína de 30 kDa) e de 150-200 mM de imidazol (33 kDa) aparecem fluorescentes.

Na tentativa de remover esta banda contaminante, diferentes estratégias foram realizadas. Para investigar se o truncamento poderia ser causado por proteases, foi realizado um teste de expressão contendo coquetéis anti-proteases, sem EDTA. No teste experimental, 2 culturas de 50 mL de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET29b-sfGFP-sSBD foram expressas na condição inicial descrita anteriormente. Entretanto, no buffer de sonicação (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM de NaCl e 20 mM de imidazol, pH 8.0) foi adicionado dois coquetéis de proteases, um inibidor de serina e cisteína-proteases (cOmplete™ Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail– cod. 11836170001 Roche™) e outro de amplo espectro, inibidor de serina, cisteína, aspartato-proteases e aminopeptidases (Pierce™ Thermo Fischer *Protease Inhibitor Mini Tablets* EDTA-free – cod. 88666) um para cada cultura, a fim de verificar se houve inibição de uma possível protease que poderia ter causado o truncamento da proteína após a lise da célula. Entretanto, após a análise de SDS-PAGE, nenhum resultado significativo foi observado para ambos os coquetéis testados, uma vez que a banda contaminante de 30 kDa permaneceu aparente na expressão e purificação de sfGFP-sSBD da mesma forma ilustrada anteriormente no perfil de eluição da figura 17.

Foi também realizada uma tentativa de separar as bandas já expressas na condição inicial por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e por troca iônica (IEX) através de um teste em resina. Para os testes HIC, foram utilizados 200 μ L das resinas Octyl (CL-4B, Cytiva) e Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High sub Cytiva) já lavadas e calibradas com 200 μ L de buffer B (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM e sulfato de amônio 30%) em microtubos de 1,5 mL. Para este ensaio em específico, foi realizado um teste de precipitação de sulfato de amônio com sfGFP-sSBD para determinar qual a o limite de solubilidade dessa proteína necessária antes de sua precipitação. A metodologia utilizada foi a mesma descrita para sfGFP no item 5.1. O teste prévio indicou que as duas bandas da proteína (33 e 30 kDa) permanecem solúvel em 30%.

Desta forma, 250 μL da sfGFP-sSBD foram diluídas em 200 μL buffer B e misturada a resina já calibrada. Após 30 minutos, os microtubos foram centrifugados (15.000 rpm por 1 minuto) e a fração não ligada à resina foi removida. 200 μL de buffer B foi utilizado para remover a fração de lavagem e um gradiente decrescente de sulfato de amônio (1M, 0,8 M; 0,6 M; 0,4 M; 0,2 M; 0,1 M; 50 mM; 20 mM; 10 mM e 0 mM ou buffer A) foi utilizado para verificar qual a menor porcentagem de saturação em que as duas bandas da proteína sfGFP-sSBD se desligam das resinas octil e fenil. As frações desligadas foram analisadas por SDS-PAGE (figura 19).

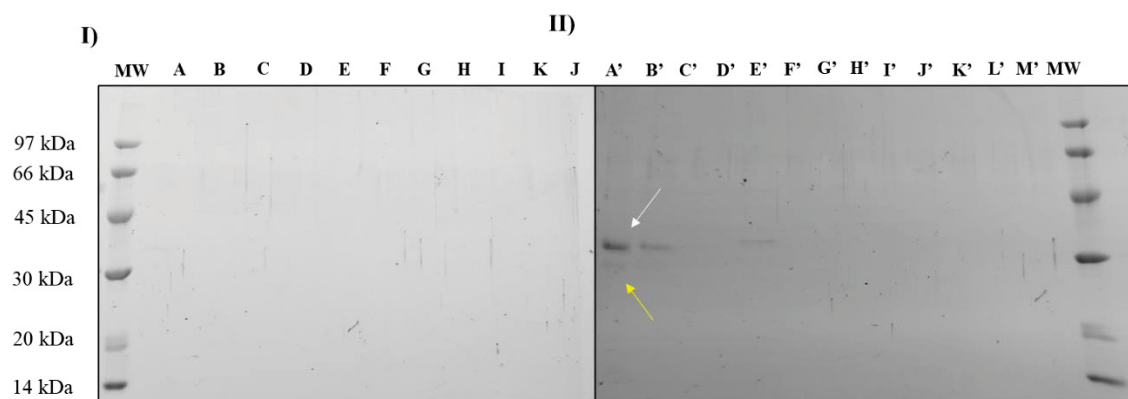


Figura 19. Gel de SDS-PAGE para teste em resina HIC de sfGFP-sSBD. Em I) foi analisado as frações eluídas de sfGFP-sSBD da resina de Phenyl Sepharose e em II) em resina de Octyl Sepharose. Legenda: marcador molecular (MW), fração não ligada à resina (A e A'); fração lavada (B e B'); 0,8 M (C e C'); 0,6 M (D e D'); 0,4 M (E e E'); 0,2 M (F e F'), 0,1 M (G e G'); 50 mM (H e H'); 20 mM (I e I'); 10 mM (K e K') e 0 mM ou buffer A (sem sulfato de amônio) (J e J'). A seta amarela aponta a proteína contaminante de 30 kDa e a branca a de 33 kDa.

Para o teste IEX, 200 μL das resinas SP-Sepharose (Fast Flow, Cytiva) e Q-Sepharose (Fast Flow, Cytiva) já calibradas com buffer A (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM) foram misturadas com 300 μL da sfGFP-sSBD e 300 μL de buffer A em microtubos de 1,5 mL. Após as etapas de centrifugação, cada fração foi eluída utilizando um gradiente crescente de NaCl (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM e 400 mM) e analisada por SDS-PAGE, como indica a figura 20.

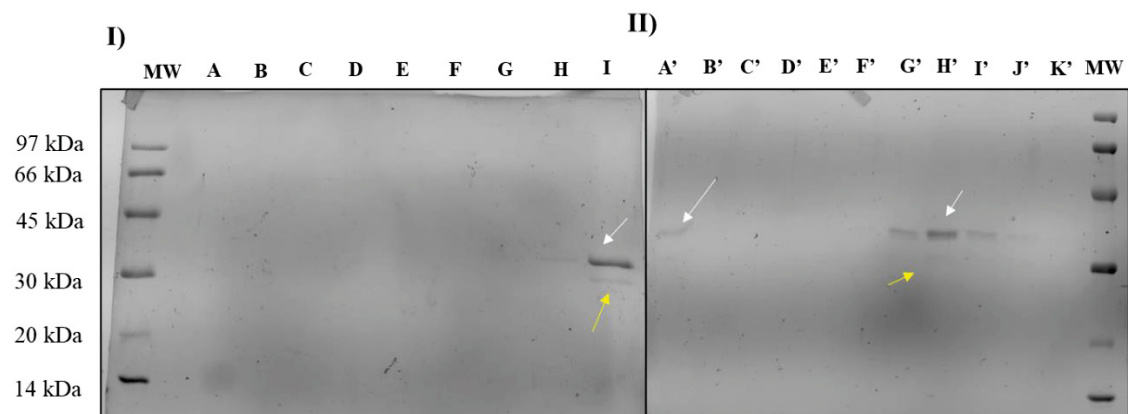


Figura 20. Gel de SDS-PAGE para teste em resina IEX de sfGFP-sSBD. Em I) foi analisado as frações eluídas de sfGFP-sSBD da resina de SP Sepharose. Legenda: marcador molecular (MW), 1M (A), 300 mM (B), 250 mM (C), 200 mM (D), 150 mM (E), 100 mM (F), 50 mM (G), frações lavada (H) e não ligada (I). Em II) foi analisado as frações eluídas de sfGFP-sSBD em resina de Q Sepharose. Legenda: fração não ligada à resina (A'); fração lavada (B'); 50 mM (C'); 100 mM (D'); 150 mM (E'); 200 mM (F'); 250 mM (G'); 300 mM (H'); 350 mM (I'); 400 mM (K') marcador molecular (MW).

Estes testes concluem que a proteína sfGFP-sSBD se liga fortemente às resinas de interação hidrofóbica, especialmente na resina de Phenyl-Sepharose, devido principalmente à cauda sSBD. Proteínas com domínios hidrofóbicos, como SBD e variantes, apresentam alta afinidade a hidrocarbonetos como radicais fenila, e dificilmente eluem em coluna HIC, mesmo sob condições amenas de sais no meio de eluição. Nesse sentido, como nenhuma das bandas de sfGFP-sSBD eluíram com a redução máxima de sulfato de amônio (0 mM) em Phenyl Sepharose, acredita-se que a banda contaminante é igualmente funcional à proteína de interesse de tamanho esperado (33 kDa) e o truncamento não afeta o domínio sSBD, pois ela permanece adsorvida à coluna ao final do gradiente.

Adicionalmente, pode-se inferir que ambas as bandas da proteína sfGFP-sSBD (30 e 33 kDa) apresentam a mesma carga negativa superficial. Desse modo, as duas bandas eluem na fração não ligada (coluna I em I da figura 20) da resina SP Sepharose. Por outro lado, o trocador aniônico Q Sepharose permitiu a eluição da sfGFP-sSBD nas frações de 200, 300 e 350 mM de NaCl de ambas as bandas (colunas G', H' e I' de II da figura 20). O truncamento, portanto, aparentemente não afeta a carga líquida da proteína e ambas as bandas apresentam a mesma carga superficial.

Rosano e Ceccarelli (2014) elencam diferentes problemas recorrentes à expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* BL21, como toxicidade da proteína expressa, viés de códon e as condições do meio, como disponibilidade escassa de nutrientes, disponibilidade oxigênio,

alterações de pH no meio decorrente da rápida produção de produtos metabólicos da fase log, agitação, tipo de indutor e temperatura, por exemplo.

Para testar a hipótese da má suplementação no meio nas bactérias contendo plasmídeos com possivelmente códons raros, um novo cultivo foi realizado em um meio TB (*Terrific Broth*), que é um meio LB suplementado, contendo glicerol e tampão fosfato e quantidades maiores de extrato de levedura em sua composição. As condições desse novo teste de expressão foram então submetidas como descrita no item anterior para os demais testes de expressão, reduzindo a temperatura e aumentando o tempo de incubação na presença do indutor. Entretanto, como demonstra a Figura 21, nenhum resultado significativo foi observado alterando as condições de expressão e suplementando o meio de cultura.

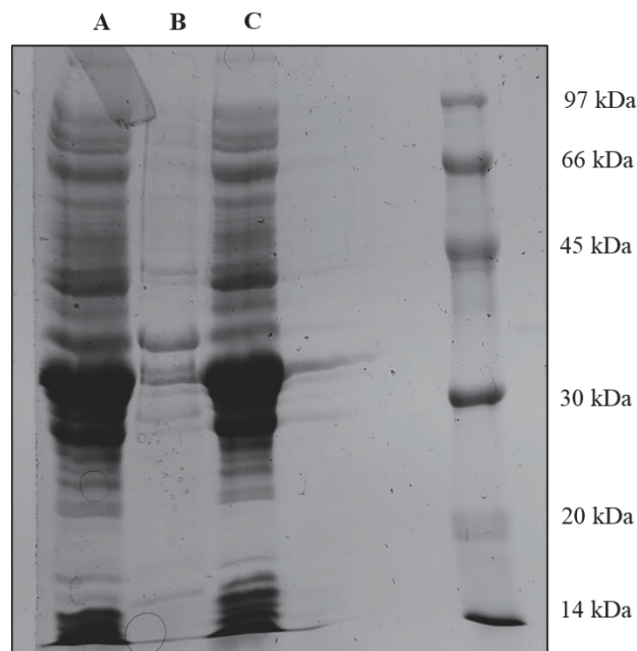


Figura 21. Gel de SDS-PAGE para expressão suplementada de sfGFP-sSBD em *E. coli* BL21 (DE3) em meio TB. A alteração do meio de cultura bacteriana de LB para TB não afetou a expressão da banda de 30 kDa A = fração solúvel, B = fração insolúvel e C = fração bruta.

Joseph et al. (2015) relatam o uso de estirpes de *E. coli* adaptadas para a expressão de proteínas que contém códons raros para o gênero e que podem ser utilizadas para contornar esse problema, como as estirpes *E. coli* Rosetta2 ou Rosetta pLysS. As estirpes de *E. coli* BL21 CodonPlus RIL e CodonPlus (DE3) – RIL/RILP, por exemplo, apresentam a vantagem de possuírem cópias extras dos genes de tRNA (*argU*, *ileY* e *leuW*) em seus genomas, os quais são essenciais para o reconhecimento de códons raros de Arg em *E. coli*, como AGA e AGG; AUA para Ile e CUA para Leu, respectivamente.

Dessa forma, uma futura abordagem é realizar novos testes de expressão utilizando novos meios de cultura, mais suplementados com aminoácidos, como SOC, SOB e YB2, além da troca do hospedeiro, preferencialmente por *E. coli* BL21 (CodonPlus RIL) ou *E. coli* Rosetta2. Apesar dos esforços em separar as bandas, como será discutido nos próximos itens, a banda de 30 kDa aparenta muito diluída na maioria dos ensaios, não afetando diretamente na imobilização das nanopartículas e, portanto, no resultado obtido.

5.4 Caracterização morfológica das nanopartículas de PHB

As nanopartículas de PHB foram produzidas a partir da técnica de nanodálise proposta por Shakeri et al. (2014). Nesta técnica, o polímero de PHB comercial é pesado a uma determinada concentração (25 mg neste estudo), misturado a um solvente orgânico e homogeneizado a 60°C para ser dialisado contra uma fase aquosa (água MiliQ autoclavada), conforme descrito no item 4.4.1. Nesta estratégia, o tamanho dos poros da membrana de diálise (cut off de 12 kDa) e o componente hidrofílico que irá compor a fase hidrofílica são essenciais para determinar o tamanho e a forma, respectivamente, das nanopartículas precipitadas (SAMROT et al., 2021).

Para caracterizar morfológicamente as nanopartículas utilizadas nos demais ensaios de funcionalização, foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), de varredura (MEV), confocal (MC) e de força atômica (AFM). A Figura 22 demonstra a morfologia por MEV e MET das nanopartículas sem proteínas (controle) após a preparação por nanodálise.

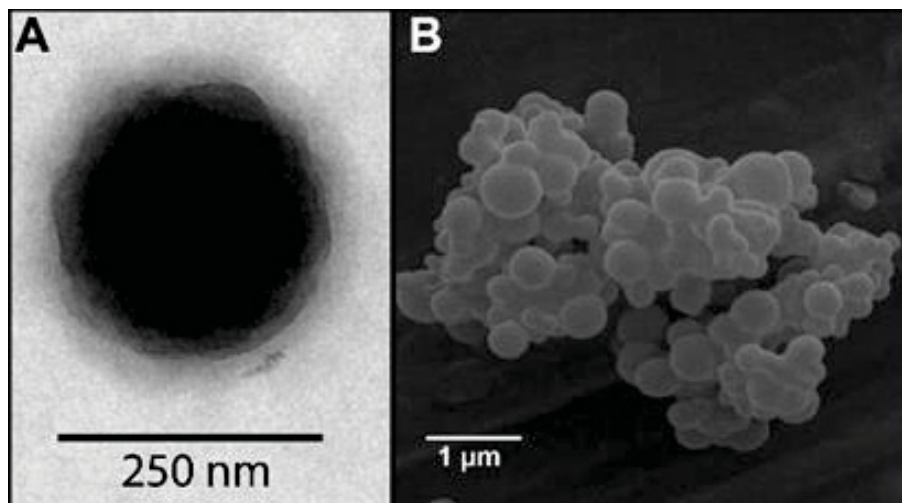


Figura 22. Caracterização morfológica das NPs de PHB sem proteína (controle). Em A) micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Em B) micrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Através da análise de MET, pode-se observar que as nanopartículas apresentam morfologia esférica, com um núcleo polimérico maciço, sugerindo sua caracterização como nanoesfera. Entretanto, nota-se também que sua superfície aparenta ser irregular. Seu diâmetro é de aproximadamente 250 nm. Em contrapartida, a análise de MEV permitiu a visualização das nanopartículas até 1 μm . Nessa ampliação, as nanopartículas não podem ser caracterizadas em detalhes individualmente, apenas em agregados. Esse resultado corrobora com os resultados de MEV obtidos nos estudos de Correa et al. (2020) e Carneiro e Ward (2018), que caracterizaram as nanopartículas de quitosana e de ouro-PEG, respectivamente, como aglomerados esféricos e subesféricos. Dados mais detalhados serão apresentados na sequência.

Acoplado à análise de MEV, foi realizado também uma análise de composição química das nanopartículas após o seu preparo por nanodiálise, através da análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), como demonstra a figura 23. Essa análise permitiu inferir que os principais componentes das nanopartículas são carbono (66,5 %) e oxigênio (30%), sem a presença de resíduos de formulação das nanopartículas como TFE, NaCl ou demais componentes contaminantes, indicando também um papel importante da diálise em água para a remoção de solvente orgânico durante o preparo das NPs. Esse resultado é esperado, visto que, como descrito no item 3.2.2, o polímero de PHB é constituído por unidades repetidas de 3-hidroxi-butarato, ligados por ligações éster (poliéster).

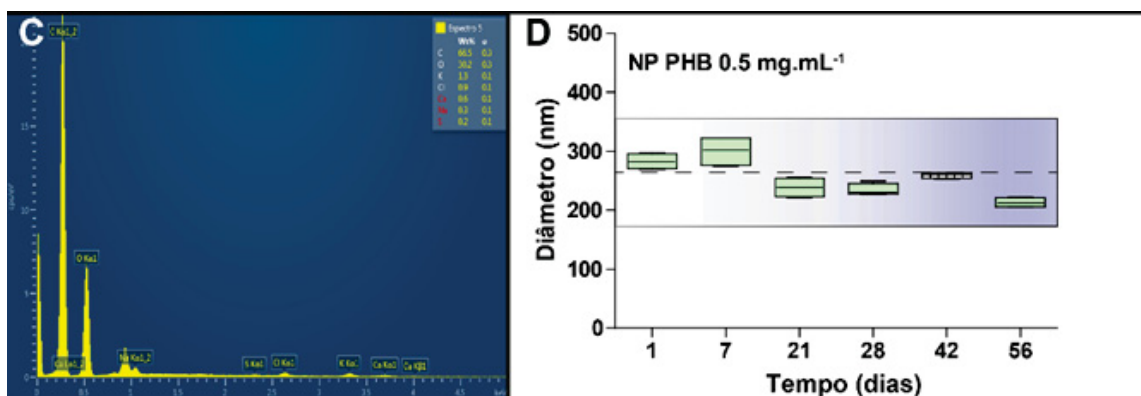


Figura 23. Análise de MEV-EDS e estabilidade das nanopartículas controle de PHB. Em C) análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) das nanopartículas, acoplado à análise de MEV. Em D) análise de integridade das nanopartículas a 4° C após preparação por nanodiálise em água ultrapura.

Para completar as análises de qualidade das nanopartículas, também foi realizado um teste de integridade das nanopartículas (Figura 23 - D) quando armazenadas a 4° C, após diálise, por quase 2 meses. Percebe-se que, ao final de quase 60 dias, o diâmetro hidrodinâmico da nanopartícula pouco variou dentro do limite de erro. Isso infere que as formulações utilizadas para síntese das nanopartículas, bem como a sua capacidade intrínseca de se manter íntegra, são propícias para a realização de diferentes repetições dos ensaios.

5.5 Funcionalização das proteínas recombinantes em nanopartículas

O termo funcionalização, segundo Thiruppathi et al. (2016), se refere à modificação superficial a que as nanopartículas são submetidas, seja por adsorção química ou física de produtos químicos ou biomoléculas, como ácido fólico, moléculas de biotina, oligonucleotídeos, peptídeos, enzimas, anticorpos entre outros. De modo geral, a funcionalização fornece propriedades extras à estrutura da NP, contribuindo para sua mobilidade, estabilidade, especificidade, biodegradabilidade e características anticorrosivas. Existem diferentes biomoléculas e estratégias disponíveis que permitem o pesquisador funcionalizar suas nanopartículas para fins específicos, cada estratégia dependendo das características físico-químicas da molécula a ser adsorvida, da natureza da nanopartícula e do meio em que o complexo possa ser inserido, geralmente em sistemas biológicos.

Por essa razão, visando um contexto imunológico de constituição de vacinas, para poder funcionalizar as nanopartículas de PHB com proteínas fluorescentes, torna-se necessário investigar fisicamente o tipo de interação que ocorre entre a superfície das nanopartículas do polímero e os resíduos de aminoácidos que compõem a cauda SBD das proteínas recombinantes, especificamente de suas variantes (sSBD e sSBDA).

Sendo assim, foi realizado inicialmente um ensaio prévio de saturação da superfície das nanopartículas pelas diferentes proteínas (item 4.4.3), o qual pretende responder qual a concentração de proteína imobilizada satura a superfície da nanopartícula. Esse dado experimental é útil para ser incorporado a isotermas de adsorção, que descrevem matematicamente o comportamento de adsorção de adsorvatos específicos, no caso, as 4 proteínas testadas, a superfícies adsorventes, neste caso, as nanopartículas. O resultado dessa equação matemática pode, de modo geral, inferir também diretamente sobre afinidade e a capacidade máxima de imobilização da proteína à nanopartícula. Em especial, a comparação

dos resultados das 4 proteínas testadas também permitiu comparar, de modo quantitativo, as diferenças de afinidade entre as *tags* propostas no objetivo desse estudo, quando se remove parte da proteína de fusão, incluindo o seu conteúdo de cisteína (variantes de SBD, sSBD e sSBDA).

O ensaio de saturação de nanopartículas por proteínas fluorescentes consistiu, conforme descrito no item 4.4.3, em adicionar um gradiente crescente de quantidade de massa de proteína conhecida (μg), a partir de suas concentrações iniciais, em microtubos independentes, os quais continham uma concentração fixa de 0,02 mg/mL de nanopartículas de PHB. A solução foi incubada a temperatura ambiente (20°C), sob agitação constante, para proporcionar as condições necessárias de adsorção das proteínas às nanopartículas. Após 20 minutos, a mistura foi centrifugada e as frações foram separadas, sendo o sobrenadante a fração de proteínas não ligadas às nanopartículas (FNL) e o *pellet* de nanopartícula contendo a fração de proteínas adsorvidas. As frações não ligadas (FNL) foram quantificadas diretamente por fluorimetria (item 4.3.4) e as frações imobilizadas foram quantificadas indiretamente subtraindo a massa de proteína adicionada nos microtubos no início do ensaio da quantidade em massa de proteína presente no sobrenadante (FNL).

Para converter as unidades relativas de fluorescência (RFU) em quantidade de massa de proteína (μg) e obter os dados de proteínas não ligadas, foi realizado uma curva de calibração de fluorescência, obtida a partir da fluorescência inicial, antes da imobilização, das próprias proteínas utilizadas no teste. A partir de uma regressão linear da curva, os coeficientes angular e linear da reta foram utilizados para converter a média das fluorescências das proteínas do sobrenadante (triplicata) em unidades de massa de proteína não ligada (μg), podendo assim, estimar indiretamente quanto de proteína foi imobilizada ao final do ensaio.

As figuras 24 e 25 mostram, respectivamente, o monitoramento das etapas durante o teste por meio de um E-gel transluminador e do resultado deste teste de saturação utilizando as proteínas sfGFP-SBD, sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA imobilizadas nas nanopartículas, juntamente com o gráfico da isoterma na sua forma linearizada.

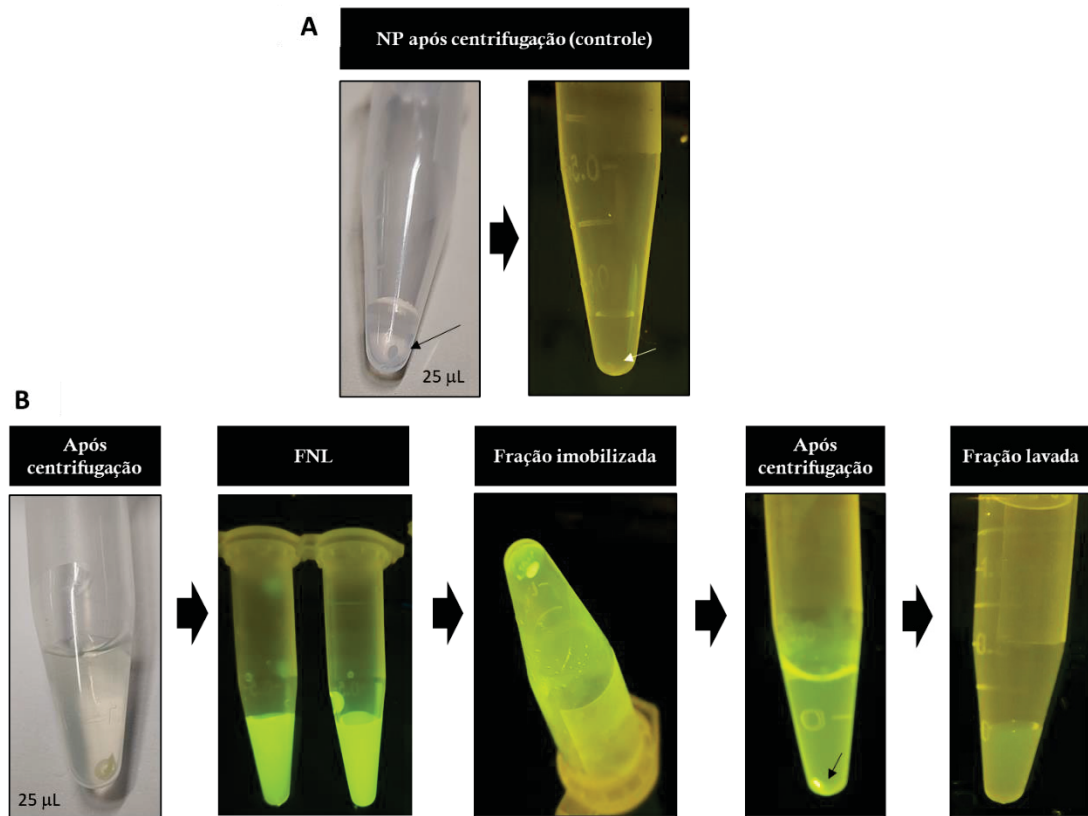


Figura 24. Etapas do teste de saturação das proteínas fluorescentes em nanopartículas de PHB. Em A) à esquerda, indicado pelas setas, *pellet* de 25 μ L de nanopartícula de PHB (0,02 mg/mL) sem proteína (controle) após a primeira etapa de centrifugação. À direita, sua imagem após exposição ao transluminador. Em B) à esquerda, solução de nanopartícula de PHB misturada à proteína sfGFP-sSBD, mostrando o pellet verde e sobrenadante (FNL) levemente verde à luz visível após a etapa de centrifugação. À direita, no transluminador, microtubos contendo apenas a sua FNL, a fração imobilizada, sua fração ressuspensa em buffer A (TrisHCl 50 mM, pH 8,0 e NaCl 150 mM) após centrifugação e sua fração lavada (FL), respectivamente.

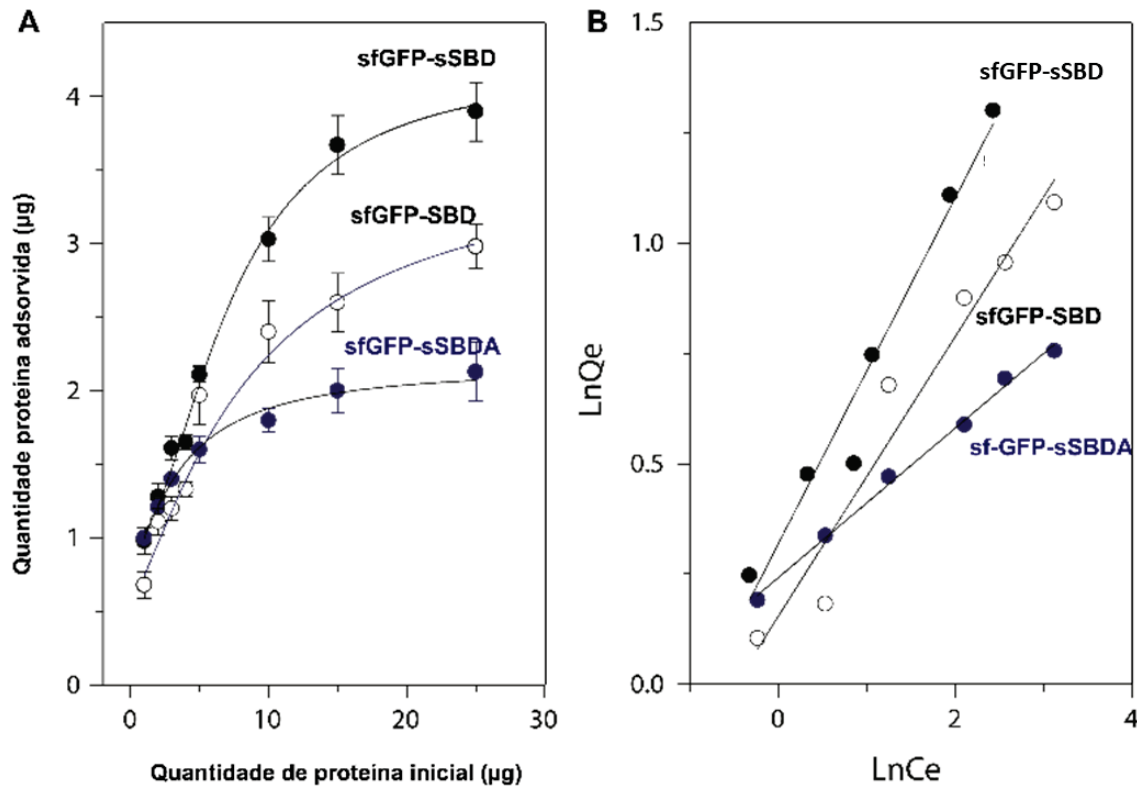


Figura 25. Isothermas de saturação de nanopartícula de PHB pelas diferentes proteínas recombinantes. Em A) Isotherma de saturação da superfície das nanopartículas de PHB pelas proteínas fluorescentes com diferentes caudas SBD (sfGFP-sSBDA em azul, sfGFP-SBD em branco e sfGFP-sSBD em preto). No eixo X, a quantidade de proteína inicial (μg) adicionada no início do teste. No eixo Y, a quantidade de proteína final adsorvida (μg) após as etapas de incubação, centrifugação e lavagem. Em B) Isotherma de Freundlich na sua forma linearizada.

Na imagem 24 (A e B) é possível notar que, em contraposição às nanopartículas controle, a imobilização das proteínas recombinantes na nanopartícula é acompanhada pela fluorescência aparente, vista nos *pellets* fluorescentes quando expostos à luz UV. Embora esses resultados sejam qualitativos e não mensuráveis, eles são úteis para indicar a imobilização da proteína na nanopartícula após as etapas de remoção do sobrenadante e de lavagem.

Para a quantificação das proteínas fluorescentes tanto no sobrenadante quanto no *pellet* centrifugado, a medição de fluorescência foi realizada, como indicado no item 4.3.4. A partir desses dados, pode-se perceber, na figura 25 (A), que as proteínas sfGFP-SBD e sfGFP-sSBD saturam a superfície de 100 nanogramas de nanopartículas em aproximadamente 15 μg , que é a fase de início do platô de saturação, característica de uma isoterma de adsorção (figura 25 A). Por outro lado, a proteína sfGFP-sSBDA aparentemente satura em 10 μg de proteína inicial. Esses dados também foram observados para a proteína RBD-SBD expressas em *E. coli* BL21

(DE3) produzidas em nosso laboratório e quantificadas por ensaio de Bradford, a qual saturou a superfície da NP em aproximadamente 15 µg de proteína.

Como descrito no item 3.3 da revisão bibliográfica, o processo de adsorção física de uma dada molécula em uma superfície sólida com capacidade adsorvente é um processo considerado extremamente dinâmico. As interações intermoleculares entre a molécula em solução e o material adsorvente são majoritariamente fracas e instáveis, sendo influenciadas por fatores externos, como temperatura, agitação, pH entre outros fatores. Dessa forma, os fenômenos de adsorção e dessorção seguem as mesmas leis da constante de equilíbrio das reações ácido-base e de energia livre de Gibbs (DO NASCIMENTO et al., 2014).

Nesse sentido, para atingir o equilíbrio de adsorção, a uma temperatura constante, a quantidade de proteína inicial adicionada na solução deve diminuir no meio devido à sua imobilização à nanopartícula, enquanto a área superficial da nanopartícula se mantém constante, devido a sua quantidade fixa disponível no início do ensaio. Após um tempo, a concentração de proteína adsorvida na superfície (C_e) se torna constante, significando que a capacidade de adsorção máxima das nanopartículas foi atingida (q_e). Neste estágio, diz-se que a superfície adsorvente foi saturada, a qual não pode mais, fisicamente, adsorver mais proteína disponível no meio, o que resulta em um excesso de proteína no sobrenadante a partir dessa fase (DO NASCIMENTO et al., 2014; LATOUR, 2014).

Essa fase de equilíbrio dinâmico, denominada de equilíbrio de adsorção, pode ser expressa graficamente através de isotermas de adsorção, as quais descrevem o comportamento de interação do adsorvato ao adsorvente até o ponto de saturação/equilíbrio. Esse dado é essencial para determinar a capacidade máxima de adsorção das nanopartículas a determinado soluto e, também, para inferir, de modo mais quantitativo, na afinidade das diferentes proteínas testadas ao polímero (DO NASCIMENTO et al., 2014, MOLLERUP, 2008).

As isotermas podem ser determinadas matematicamente a partir de uma equação geral (equação 1), a qual utiliza os dados experimentais de ponto de saturação (C_e) e capacidade de adsorção do adsorvente (q_e), obtidos por ensaios de saturação.

$$q_e = \frac{(C_o - C_e) \times V}{m} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo q_e a capacidade de adsorção do adsorvente; C_o é a concentração inicial do adsorvato (ou proteína neste caso); C_e é a concentração do adsorvato no equilíbrio; V é o volume da amostra e m é a massa do adsorvato. Existem diferentes isotermas disponíveis para descrever

os processos de adsorção, os quais variam conforme as suas premissas. Cada modelo possui adaptações da fórmula geral (equação 1), a qual permite o pesquisador ajustar os dados obtidos do seu ensaio às características do seu adsorvente e de seu adsorvato e à realidade a qual é submetido o experimento (PIEKARSKI; IGNATOWICZ; DABROWSKI, 2021).

Embora a isoterma de Langmuir seja a mais comum e amplamente utilizada para imobilização de proteínas em nanopartículas (GAN et al., 2006; LATOUR, 2014; MOLLERUP, 2008; PAVINATTO et al., 2010; TOPOGLIDIS et al., 2001), ela utiliza como premissa básica que a superfície do material adsorvente é homogênea, ou seja, que todos os sítios de adsorção possuem a mesma energia livre capaz de imobilizar os adsorvatos. Essa premissa também leva em consideração comportamentos de uma monocamada reversível, descartando efeitos de múltiplas camadas de adsorção por seus adsorvatos e sugerindo que essa monocamada é instável e sujeita ao processo dinâmico de dessorção. Finalmente, este modelo também considera que a imobilização de uma proteína em determinado sítio de adsorção não interfere direta e indiretamente na capacidade de adsorção da molécula vizinha nem altera a energia do sítio adjacente presente na superfície do adsorvente (PIEKARSKI; IGNATOWICZ; DABROWSKI, 2021).

Como observado nas imagens de microscopia (MET, MEV, AFM e confocal), a superfície das nanopartículas de PHB são irregulares e apresentam rugosidades, com sítios de diferentes energias de adsorção (hidrofóbicos e hidrofílicos), apresentando variada cristalinidade dependendo da técnica de síntese, além da susceptibilidade à biodegradação. Por esse motivo, a isoterma que melhor se encaixa nas condições ideais expostas às características da nanopartícula e à estrutura conformacional das proteínas é a isoterma de Freundlich.

A isoterma de Freundlich presume que a superfície do adsorvente é heterogênea e possui diferentes sítios de adsorção com energias distintas. Nesse modelo, a energia de adsorção do material adsorvente decresce à medida que a superfície vai se tornando coberta pelo soluto, como uma monocamada não reversível saturada, o que a diferencia da equação de Langmuir. Nesse modelo, a imobilização de um adsorvato altera a energia livre de adsorção do sítio vizinho, o que torna a superfície rapidamente monocoberta (saturada), sem interferência de dessorção (FREUNDLICH, 1906; FEBRIANTO, et al., 2009). A equação geral adaptada de Freundlich é a equação 2 a seguir:

$$Q_e = mC_e^{1/n} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo C_e a quantidade de proteína não ligada quantificada no sobrenadante após centrifugação; Q_e corresponde à massa adsorvida de proteína; m é uma função complexa que descreve a capacidade máxima do adsorvente e a sua afinidade de ligação com as nanopartículas e $1/n$ é o índice de heterogeneidade da superfície. Os dados de imobilização foram plotados de acordo com a forma linearizada da equação (equação 3):

$$\ln(Q_e) = \ln(m) + \frac{1}{n} \ln(C_e) \quad (\text{Equação 3})$$

A linearização das isotermas é importante para facilitar o ajuste dos modelos aos dados experimentais por meio de regressão linear. A forma linear da isoterma de Freundlich para o ensaio de saturação envolvendo as proteínas sfGFP-SBD, sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA são mostrados na figura 25 (B). Percebe-se que a reta ajustada dos dados de sfGFP-sSBD apresenta um maior *slope*/ângulo de inclinação ($1/n$), logo, oferece mais intensidade de adsorção em relação à sfGFP-SBD e sfGFP-sSBDA.

O modelo considera diferentes sítios de interação e afinidades através da introdução de parâmetros complexos, que permitem melhor avaliar a afinidade entre as diferentes estruturas. Os ajustes dos parâmetros para a isoterma são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros de ajuste da isoterma de adsorção de Freundlich

Proteínas	m	1/n	r²
sfGFP-sSBD	1,36	0,39	0,999
sfGFP-sSBDA	1,27	0,16	0,997
sfGFP-SBD	1,16	0,31	0,974

De modo geral, os dados da tabela 6 resumem que a proteína com maior afinidade pelas nanopartículas é a sfGFP-sSBD, provocando maior impacto sobre a heterogeneidade da superfície em comparação às demais. Segundo Singh (2016), o parâmetro m corresponde à capacidade de adsorção do adsorvato na concentração do ponto de saturação. Um valor mais elevado de m corresponde a uma maior capacidade de adsorção e, conseqüentemente, uma maior afinidade pelo adsorvente. Nesse sentido, avaliando apenas o parâmetro m no ponto de saturação, as variantes sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA aparentam ter ligeiramente mais afinidade às nanopartículas do que a proteína sfGFP-SBD. Esses dados corroboram, em partes, com os dados obtidos pelo SPR, descrito na secção 5.12.

Por outro lado, o valor de $1/n$ permite estimar a intensidade de adsorção de uma determinada substância na superfície do adsorvente. Quanto mais intensivo o processo de adsorção, maior o valor de $1/n$. Logo, a proteína sfGFP-sSBD também aparenta ter maior capacidade de ancoragem do que as demais proteínas testadas. Entretanto, comparando o valor de $1/n$ entre as outras duas proteínas, a proteína sfGFP-SBD aparenta ter uma intensidade de adsorção maior do que a sfGFP-sSBDA, discordando dos valores de m . Isso sugere que a proteína sfGFP-sSBDA, a qual possui todos os seus resíduos de cisteína mutados em seu domínio SBD, tem menor intensidade de adsorção, apesar de ter mais afinidade pelo PHB. Esses dados estão de acordo com o observado nos resultados de densitometria de banda, apresentados na secção 4.4.4.

De modo geral, os dados da figura 25 refletem que é necessário fornecer 10 a 15 μg de proteína no sistema para que, ao final do processo, sejam imobilizadas 1,8 μg ; 2,5 μg e quase 4 μg de sfGFP-sSBDA, sfGFP-SBD e sfGFP-sSBD, respectivamente, para 160 ng de nanopartículas de PHB. Com esses dados pode-se também calcular a concentração, em porcentagem, de proteína imobilizada e seu respectivo rendimento de imobilização, através das equações 4 e 5, respectivamente (TIAN et al., 2021).

$$P_i (\%) = \left(\frac{P_o - P_f}{P_o} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo P_i a porcentagem de proteína imobilizada; P_o a quantidade de proteína inicial e P_f a quantidade de proteína presente no sobrenadante ao final da reação de adsorção (FNL).

$$R_i (\%) = \left(\frac{F_{\text{imobilizado}}}{F_o} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo R_i o rendimento de imobilização, dado em porcentagem; $F_{\text{imobilizado}}$ é a fluorescência indireta da proteína imobilizada na nanopartícula, dada em RFU; F_o é fluorescência inicial da proteína livre em solução, antes da imobilização, também dada em RFU. O resultado das equações é apresentado na tabela 7 abaixo.

Tabela 7. Porcentagem e rendimento de imobilização das proteínas recombinantes sobre o PHB.

Proteínas	Porcentagem de proteína imobilizada (P_i) - %	Rendimento de imobilização (R_i) - %
sfGFP-SBD	16,6	14,5
sfGFP-sSBD	25,3	19,6
sfGFP-sSBDA	18	8,46

Os dados de sequestro de fluorescência corroboram os resultados de densitometria de banda de gel de SDS-PAGE e da isoterma mostrados mais adiante, indicando que a proteína sfGFP-sSBD apresenta, entre as três proteínas testadas, a maior afinidade, intensidade de adsorção estimada e rendimento de imobilização ao PHB, seguido da sfGFP-SBD e por fim, a proteína sfGFP-sSBDA. Nota-se que apesar de haver mais proteína sfGFP-sSBDA imobilizada à nanopartícula do que proteína sfGFP-SBD (18% vs. 16,6%) a sSBDA apresenta menor rendimento de imobilização (8,46%) em relação à sfGFP-SBD (14,5%). Isso está de acordo com a situação discutida anteriormente sobre os valores de m e $1/n$ dos parâmetros de ajuste das isotermas. Entretanto, com esses dados, não é possível estabelecer dados quantitativos precisos da força de interação entre as *tags* e a nanopartícula. Esses dados fornecem apenas estimativas empíricas de adsorção.

Uma das limitações dessa isoterma é que o gráfico é linear até 50% da saturação máxima, aproximadamente (SINGH, 2016). Piekarski et al. (2021) complementam que a quantidade de substância adsorvida pode aumentar indefinidamente juntamente com o aumento da concentração de equilíbrio, mas na realidade, o adsorvente torna-se saturado. Essa situação justifica a omissão dos pontos de 30 e 40 μg das três proteínas no gráfico, uma vez que a partir dessas concentrações, por conta de valores flutuantes, o gráfico perde a linearidade. A isoterma de Freundlich, portanto, é sensível a concentrações elevadas de proteína. O que sugere que a partir de 30 μg , as proteínas possam estar oligomerizando em solução, antes mesmo de adsorverem na nanopartícula. Como consequência desse comportamento, após a centrifugação, os agregados sedimentam juntamente com as nanopartículas ao fundo do microtubo, alterando a sensibilidade do ensaio de fluorescência a partir desse ponto e, conseqüentemente, afetando o *fitting* da isoterma. Esse comportamento de agregação será discutido mais a diante na secção 5.6.

Ao contrário das proteínas recombinantes imobilizadas, as quais interagem especificamente com a superfície da nanopartícula devido à presença da cauda SBD C-terminal, a proteína sfGFP interage fracamente com o polímero, e de forma inespecífica, sugerindo que fases de adsorção e dessorção simultâneas possam ocorrer, o que reflete no seu total desligamento das nanopartículas após as etapas de lavagem e centrifugação, como pode ser visto no teste de saturação dessa proteína (figura 26).

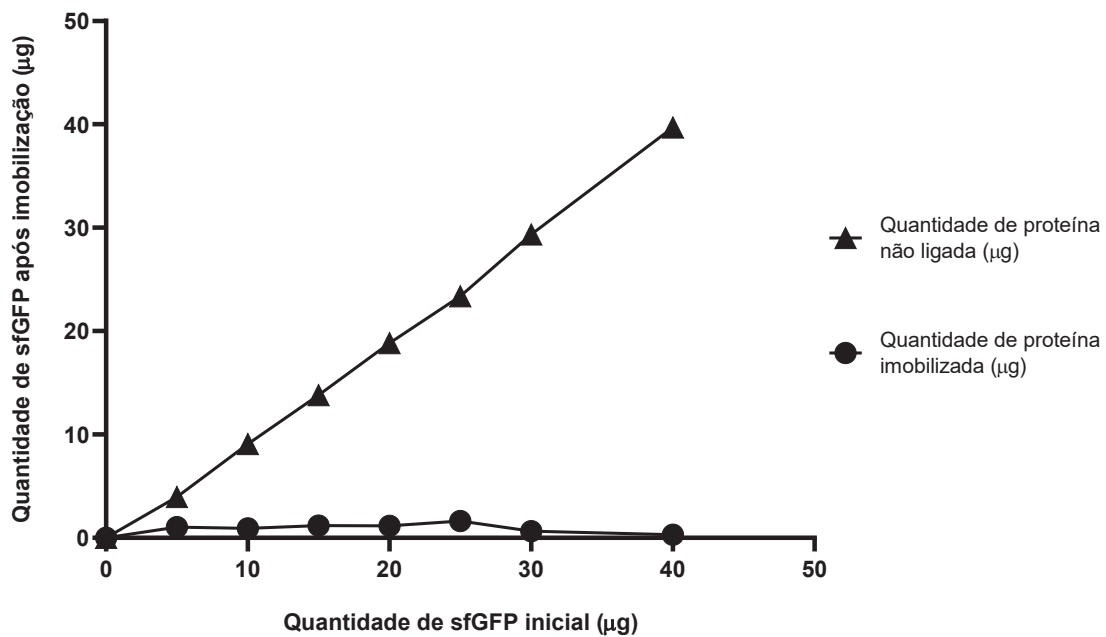


Figura 26. Curva de saturação de sfGFP em nanopartículas de PHB. O ensaio foi conduzido conforme descrito nos itens 4.3.4 e 4.4.3. No eixo X estão dispostas as quantidades de massa de proteína (µg) inicial, adicionadas antes do ensaio com as NPs. No eixo Y, as quantidades de massa (µg) estimadas de proteína final adsorvida na superfície das NPs. Os valores de quantidade de proteína imobilizada foi estimado indiretamente através da subtração dos valores de massa de proteína inicial pela média dos valores de massa de proteína obtida na fração não ligada (sobrenadante) após o período de imobilização.

É possível perceber que a quantidade de sfGFP não atinge um platô de saturação nas superfícies das nanopartículas e as quantidades em massa de proteína na FNL (sobrenadante) após o período de imobilização seguem um padrão diretamente proporcional à quantidade de proteína inicial ($R = 0,99$). Percebe-se ainda que a quantidade de proteína adsorvida neste ensaio variou de 0,5 a 1 µg de proteína, muito inferior à imobilização das proteínas apresentadas anteriormente. Adicionalmente, essas concentrações adsorvidas não são contínuas, variando em alguns pontos da curva durante o experimento.

Isso pode ser explicado pelas fracas interações inespecíficas que ocorrem com o polímero, sendo facilmente desligadas da nanopartícula após a etapa de centrifugação. Esse resultado corrobora às imagens de microscopia confocal e com o resultado de SPR, mostrados mais adiante.

5.6 Análise densitométrica da imobilização das proteínas nas nanopartículas

Para confirmar os resultados obtidos na secção anterior (5.5), foi também estimada a concentração de proteínas imobilizadas nas nanopartículas pela técnica de densitometria das bandas de proteína de um SDS-PAGE, a fim de determinar o ponto de saturação de cada proteína na nanopartícula. A densitometria de bandas de proteínas é amplamente empregada como um método quantitativo relativo para estimativa da concentração de proteína em um gel de poliacrilamida e de *Western Blott*. Essa técnica é realizada com o auxílio de um software que converte os pixels de uma área retangular da imagem do gel após a corrida em quantidade de proteína presente na banda, desde que utilize como parâmetros os coeficientes linear e angular de uma regressão linear de uma proteína com concentrações conhecidas, utilizada como curva padrão, como BSA (albumina de sorno bovino), OV (ovoalbumina) ou CA (anidrase carbônica) (VILELLA et al., 2020).

Para desnaturar e desligar as proteínas imobilizadas das nanopartículas funcionalizadas, após a lavagem foi utilizado o detergente SDS do tampão de amostra para ressuspender as NPs. A mistura foi incubada a temperatura de aquecimento (100 °C) (BELLO-GIL et al., 2018). Após uma etapa de centrifugação, as proteínas desligadas presente no sobrenadantes sofram submetidas à análise de SDS-PAGE e o gel de poliacrilamida após a corrida foi corado com Coomassie Blue. Após a completa descoloração do background do gel com descorante apropriado, uma foto no formato jpg. foi tirada do gel e ajustada nos parâmetros de imagem para ser importada no software que faz a conversão da área delimitada dos pixels de cada banda em concentração de proteína, de forma arbitrária. As figuras 27, 28, 29 e 30 são referentes à análise de SDS-PAGE e a tabela 8 para a densitometria das bandas de sfGFP-SBD, sfGFP-sSBD, sfGFP-sSBDA e sfGFP, respectivamente, após o teste imobilização. Para padronizar as análises, foram aplicados um volume fixo de 10 µL de sobrenadante em todos os géis.

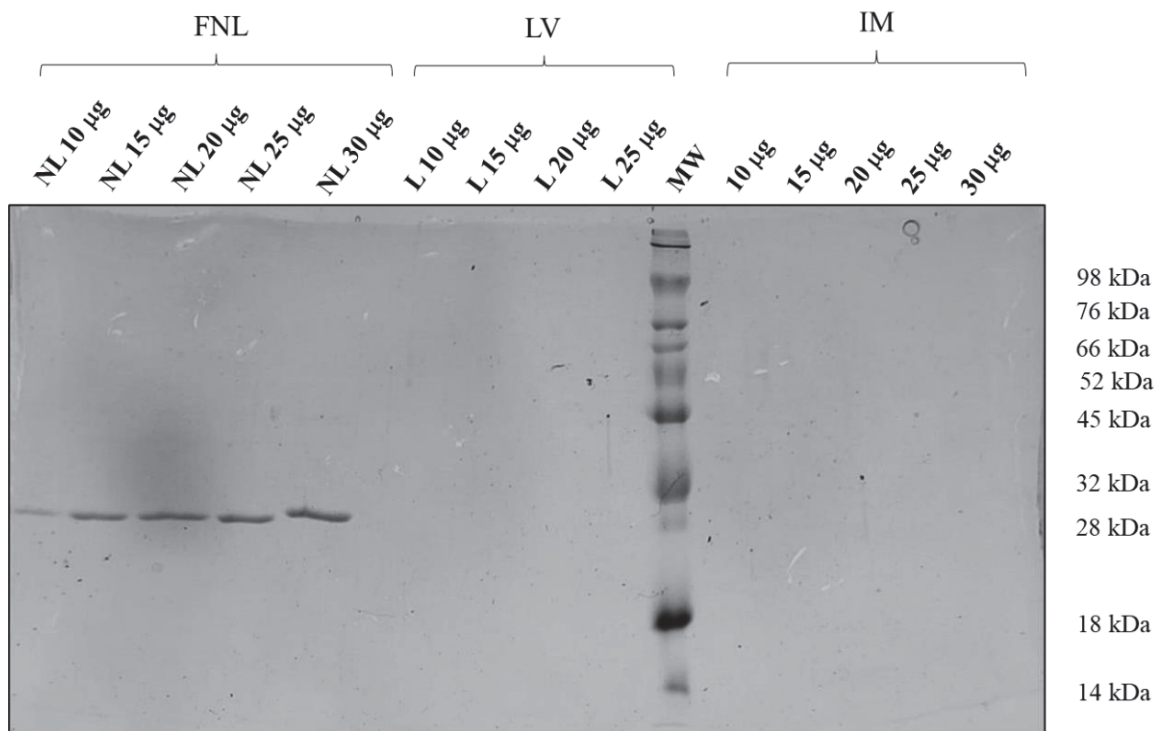


Figura 27. Análise por SDS-PAGE do teste de saturação de nanopartículas utilizando sfGFP. As nanopartículas (0,02 mg/mL) foram misturadas com 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 µg de sfGFP por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fração não ligada (FNL) foi removida e o pellet foi lavado 2 vezes (LV). A fração imobilizada (IM) foi ressuspensa em tampão de amostra e 10 µL de cada fração foi analisada por SDS-PAGE. Legenda: MW é o marcador molecular, FNL são as frações não ligadas, nas unidades de massa de 10 a 30 µg. LV são as frações lavadas, nas unidades de 10 a 25 µg. IM são as frações de 10 a 30 µg de proteína imobilizada.

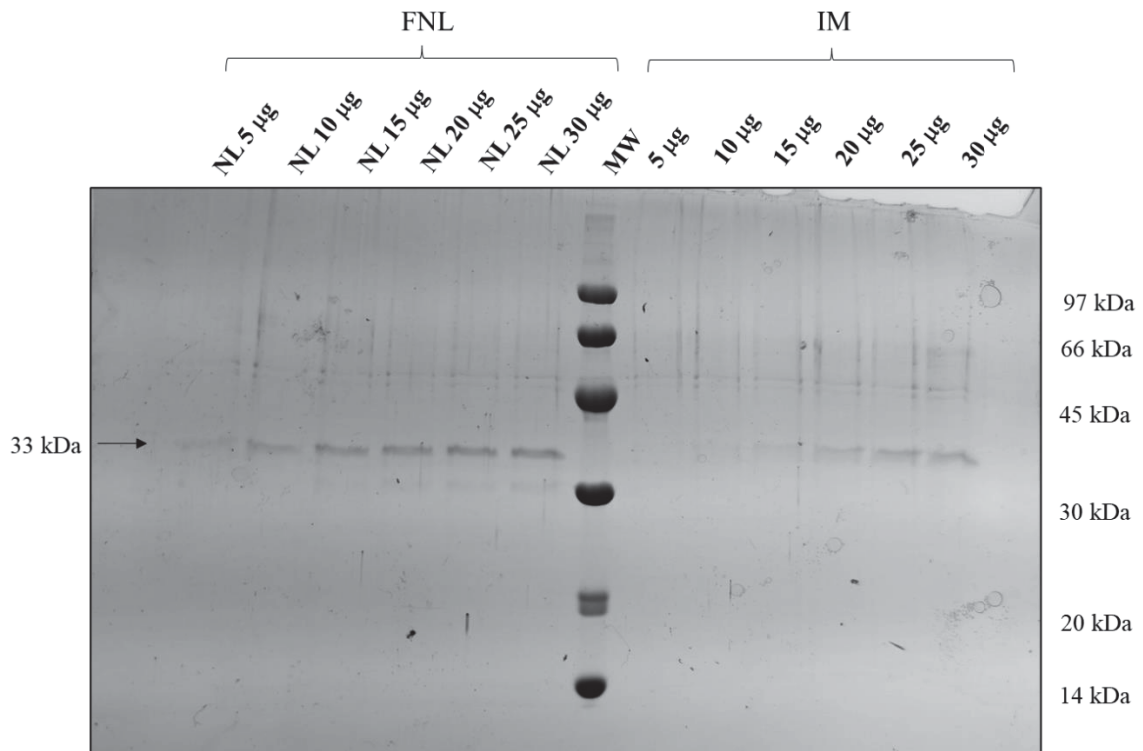


Figura 28. Análise por SDS-PAGE do teste de saturação de nanopartículas utilizando sfGFP-SBD. As nanopartículas (0,02 mg/mL) foram misturadas com 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 μg de sfGFP-SBD por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fração não ligada (FNL) foi removida e o pellet foi lavado 2 vezes. A fração imobilizada (IM) foi ressuspensa em tampão de amostra e 10 μL de cada fração foi analisada por SDS-PAGE. Legenda: MW é o marcador molecular, FNL são as frações não ligadas. IM são as frações imobilizadas.

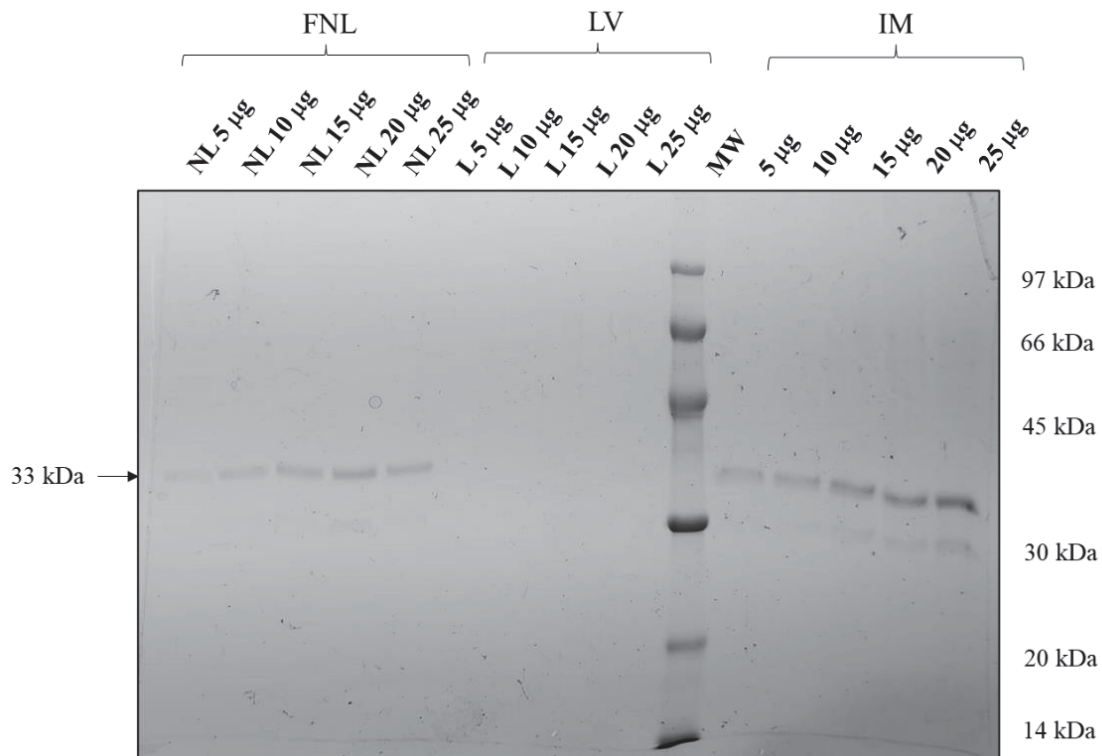


Figura 29. Análise por SDS-PAGE do teste de saturação de nanopartículas utilizando sfGFP-sSBD. As nanopartículas (0,02 mg/mL) foram misturadas com 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 μg de sfGFP-sSBD por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fração não ligada (FNL) foi removida e o pellet foi lavado 2 vezes (LV). A fração imobilizada (IM) foi ressuspensa em tampão de amostra e 10 μL de cada fração foi analisada por SDS-PAGE. Legenda: MW é o marcador molecular, FNL são as frações não ligadas, nas unidades de massa de 5 a 25 μg . LV são as frações lavadas, nas unidades de 5 a 25 μg . IM são as frações de 5 a 25 μg de proteína imobilizada.

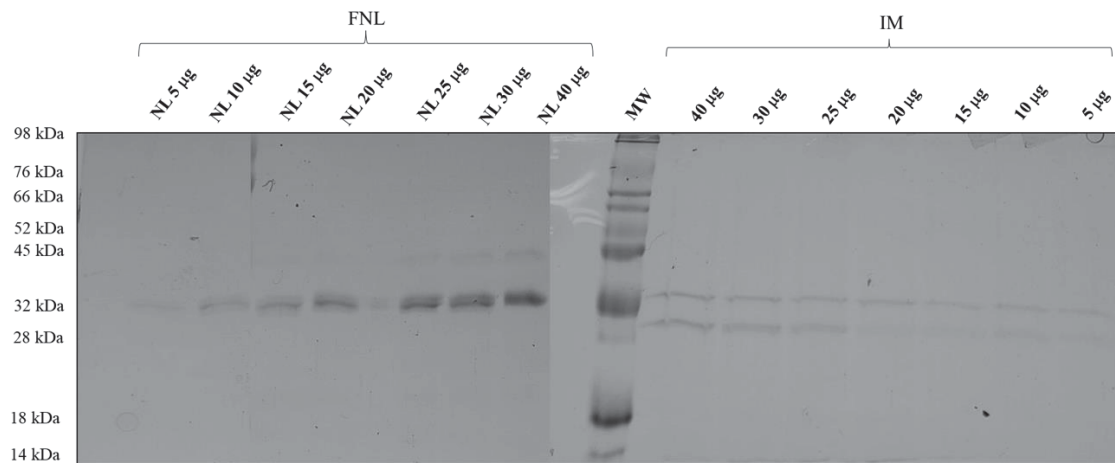


Figura 30. Análise por SDS-PAGE do teste de saturação de nanopartículas utilizando sfGFP-sSBDA. As nanopartículas (0,02 mg/mL) foram misturadas com 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 µg de sfGFP-sSBDA por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fração não ligada (FNL) foi removida e o pellet foi lavado 2 vezes. A fração imobilizada (IM) foi ressuspensa em tampão de amostra e 10 µL de cada fração foi analisada por SDS-PAGE. Legenda: MW é o marcador molecular, FNL são as frações não ligadas (5 a 40 µg). IM são as frações de proteína imobilizada (5 a 40 µg).

Os resultados da análise por SDS-PAGE apontam que a proteína sfGFP-sSBD apresenta melhor imobilização entre as quatro proteínas testadas, visto a quantidade estimada visualmente de proteína que imobilizou nas bandas da sua fração imobilizada (IM), comparado às frações imobilizadas das demais proteínas, principalmente na Figura 27, em que toda a proteína sfGFP aparece na fração não ligada (FNL). Além disso, foi possível notar dentro de cada tratamento, a proporção de proteína entre as frações ligadas e não ligadas, onde a quantidade de proteína não ligada de sfGFP-sSBDA e sfGFP-SBD é visivelmente superior às suas respectivas frações ligadas, na qual as bandas aparecem rasas e pouco concentradas. Esse resultado indica baixa afinidade de imobilização na nanopartícula e corresponde com os dados obtidos pelos parâmetros da isoterma. O mesmo não pode ser dito na figura 29, onde a diferença sutil de densidade aparente de proteína entre as bandas das frações não ligadas e imobilizadas de sfGFP-sSBD não apresentam proporções diferentes, visualmente.

Com relação à estimativa de saturação, as figuras 29 e 28 apontam que as proteínas sfGFP-sSBD e sfGFP-SBD, respectivamente, tendem a saturar as nanopartículas a partir de 25 µg, onde a partir dessas bandas as suas intensidades aparentam ser similares e constantes. Em contrapartida, a intensidade das bandas que correspondem às frações não ligadas variam conforme aumenta a quantidade de proteína inicial introduzida no sistema, o que indica que começa a sobrar proteína no sobrenadante. Para verificar se esses dados correspondem aos dados da isoterma de adsorção descrita no item anterior (5.5), uma análise quantitativa para

estimar mais precisamente quanto de proteína tem em cada 10 μL aplicados em cada *lane*, foi realizado uma análise densitométrica de cada fração presente nos géis de poliacrilamida através do software ImageJ, como indica a tabela 8 abaixo.

Tabela 8. Densitometria das bandas das frações não ligadas e imobilizadas das proteínas

Concentração inicial (μg)	sfGFP		sfGFP-SBD		sfGFP-sSBD		sfGFP-sSBDA		
	FNL (μg)	F.IM (μg)	FNL (μg)	F.IM (μg)	FNL (μg)	F.IM (μg)	FNL (μg)	F.IM (μg)	F.IM' (μg)
5	-	-	0,75	0,30	0,38	0,57	0,52	0,41	0,33
10	0,71	0,00	0,95	0,35	0,47	0,65	0,82	0,46	0,35
15	1,26	0,00	1,74	0,54	0,60	0,92	1,41	0,47	0,33
20	1,41	0,00	2,09	0,61	0,79	1,04	2,17	0,55	0,34
25	1,40	0,00	2,08	1,53	0,61	1,56	2,70	0,55	0,61
30	1,97	0,00	2,58	1,17	-	-	3,16	0,62	0,80
40	-	-	-	-	-	-	3,48	0,76	0,88

Legenda: FNL corresponde às frações não imobilizadas, F.IM corresponde às frações imobilizadas e F.IM' corresponde às frações imobilizadas da proteína contaminante (~ 30 kDa).

A partir da quantificação relativa de proteína por banda através densitometria, fica evidente que 25 μg de sfGFP-sSBD e de sfGFP-SBD não saturam a nanopartícula. Nota-se que a partir dessas concentrações, as proteínas continuam imobilizando a nanopartícula. Esses resultados podem ser explicados por particularidades da técnica. Além do volume da mistura proteína:tampão de amostra e do volume real aplicado no gel (10 μL), também deve ser levado em consideração outro parâmetro: a técnica por densitometria é apenas um ensaio semi-quantitativo, baseado na intensidade de pixels presentes na banda da proteína de interesse. Essa intensidade de pixels é extremamente relacionada à afinidade específica do corante Coomassie Blue para cada proteína, o que não significa que todas as proteínas devem ter o mesmo padrão de coloração (GRASSMANN et al., 2009).

Adicionalmente, esses dados de densitometria podem ser subestimados em decorrência dessa afinidade. Para tentar normalizar esses dados, é utilizado uma curva padrão com BSA, cujas concentrações são conhecidas. Neste ensaio densitométrico, uma solução de BSA nas concentrações de 0,6; 1; 2 e 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foram misturadas ao tampão de amostra, fervidas e aplicadas ao gel de poliacrilamida para verificar seu bandamento por SDS-PAGE. A partir da regressão linear da quantificação de pixels das suas bandas pelas concentrações de proteína

aplicadas, foi possível estimar a quantidade de proteína de interesse havia na amostra. Por isso, esse ensaio fornece dados relativos, mas não medidas absolutas, cujos valores dependem também da afinidade de cada proteína ao corante, especialmente a proteína padrão, como BSA. Os valores mais sensíveis da estimativa de quanto de proteína imobilizou as nanopartículas são extraídos majoritariamente dos ensaios de saturação envolvendo a emissão de fluorescência inicial das proteínas e no sobrenadante.

Em geral, os dados densitométricos foram úteis para verificar que o padrão de imobilização entre as proteínas se mantém. Enquanto 25 µg de sfGFP-SBD são necessários para imobilizar 1 µg de proteína em nanopartícula quando analisado apenas 10 µL da fração imobilizada, com 20 µg de sfGFP-sSBD já imobiliza a mesma quantidade no mesmo volume analisado, apresentando pelo menos 3x mais afinidade de imobilização ao PHB do que sfGFP-SBD. Em contrapartida, mesmo aplicando 40 µg de sfGFP-sSBDA na reação de imobilização, nem 1 µg de proteína em 10 µL de amostra foram imobilizados.

Em relação às frações não ligadas, esse comportamento também se mantém. Nota-se que 2 µg de sfGFP-sSBDA e sfGFP-SBD sobram no sobrenadante (FNL) quando se aplica no gel 10 µL da fração imobilizada por 20 µg dessas proteínas no início do teste de saturação. Em comparação, nem 1 µg de proteína permanece no sobrenadante quando se analisa o mesmo volume de amostra aplicado no gel, correspondente à fração imobilizada de sfGFP-sSBD. Sendo assim, é possível notar que o padrão de imobilização obtido a partir dos dados de densitometria se alinham com os dados obtidos pelos testes fluorimétricos de adsorção e dessorção e pelos parâmetros observados de Freundlich.

É possível notar também que, com exceção da proteína sfGFP-sSBDA, nas análises densitométricas dos géis das proteínas sfGFP-sSBD e sfGFP-SBD não apresentam a banda de 30 kDa, que corresponde à proteína contaminante, como discutido nos resultados do item 5.3. Acredita-se que essa banda em questão não interfira de forma significativa na imobilização dessas duas proteínas, visto o estado de diluição em que ela se encontra, pelo menos nas quantidades de proteína utilizadas nestes testes.

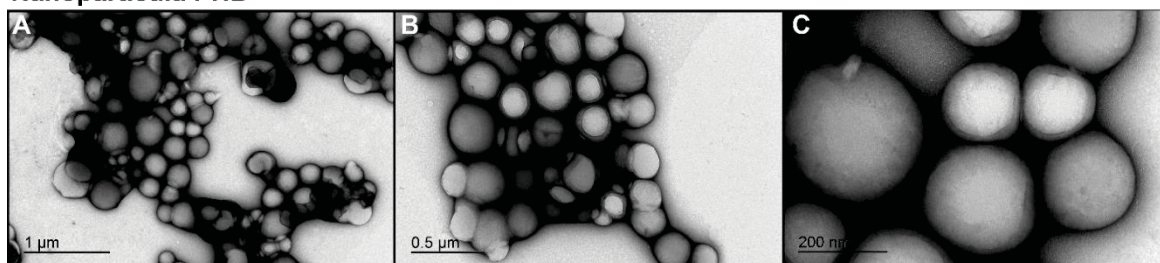
Entretanto, para a proteína sfGFP-sSBDA, a banda que corresponde à proteína contaminante aparenta ter efeitos significativos na imobilização de sfGFP-sSBDA nas nanopartículas (figura 30). Por densitometria (frações F.IM' na tabela 8), é possível perceber que a relação de quantidade de sfGFP-sSBDA e da proteína contaminante é quase 10:1 em menores concentrações, o que é um efeito contrastante com as demais proteínas. A partir de

25 μg , nota-se que a concentração da proteína contaminante excede ligeiramente a sfGFP-SBDA nas suas frações imobilizadas, apresentando certa superioridade de imobilização. Nesse contexto, os dados sugerem talvez um efeito competitivo entre ambas as proteínas, visto que desde 5 μg , a proteína contaminante se mostrava presente e, com o aumento de quantidade de proteína adicionada no sistema, mais proteína contaminante vai imobilizando e menos sfGFP-SBDA se torna imobilizada. Como a proteína contaminante também emite fluorescência, os resultados nos testes de saturação e dessorção para essa proteína possam estar refletindo o efeito de imobilização da proteína contaminante e subestimando o efeito de sfGFP-SBDA.

5.7 Caracterização morfológica das nanopartículas funcionalizadas por proteínas recombinantes por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e de Varredura (MEV)

Após a funcionalização das nanopartículas com as proteínas, novas análises de microscopias foram realizadas (figura 31), em diferentes ampliações, cuja metodologia foi descrita nos itens 4.4.6 – 4.4.8.

Nanopartícula PHB



Nanopartícula PHB:GFP-SBD

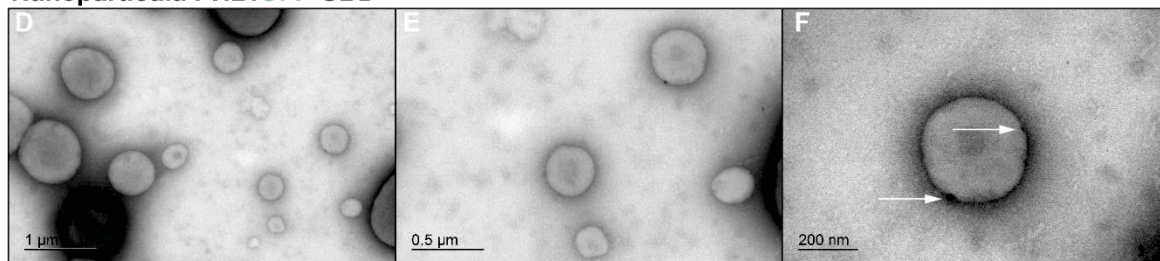


Figura 31. Imagens de MET de nanopartículas funcionalizadas com a proteína sfGFP-SBD em diferentes ampliações. Em A-C) micrografia eletrônica das nanopartículas de PHB controle, antes da funcionalização com a proteína, nas ampliações de 1 μm , 0,5 μm e 200 nm, respectivamente. EM E-F) micrografia eletrônica das nanopartículas após imobilização com sfGFP-SBD, nas ampliações 1 μm , 0,5 μm e 200 nm, respectivamente. As setas brancas destacam a interface de uma nanopartícula contendo depósitos eletrondensos (F), atribuídos à proteína adsorvida.

Para a análise de MET, as nanopartículas funcionalizadas com a proteína sfGFP-SBD (D, E e F) não apresentaram diferença morfológica quando comparadas às morfologias das nanopartículas controle (não funcionalizadas) (A, B e C), pois ambas mantêm o formato esférico e maciço, com superfície irregular. Com relação ao tamanho, o tamanho observado das nanopartículas na imagem de MET (100-300 nm) comprovam os dados obtidos por DLS, conforme indica o item 5.8.

Entretanto, nota-se principalmente na figura F (ampliação de 200 nm) a presença de pontos eletrodensos (indicados pelas setas em branco) na periferia de uma nanopartícula, mas o mesmo não é observado em seu interior nem nos tratamentos controle (A, B e C). Adicionalmente, nas nanopartículas onde ocorre esses pontos, pode se notar que a irregularidade da superfície é levemente acentuada em relação ao tratamento controle. Essas características sugerem a presença da proteína sfGFP-SBD ancorada na sua interface das NPs, uma vez que esta pode se complexar ao contraste negativo intrínseco da própria técnica, a qual utiliza o acetato de uranila para impedir o tráfego eletrônico. Ressalta-se que nas figuras A, B e C (controle), as nanopartículas são apresentadas como um objeto sólido e impenetrável ao contraste, o que imprime apenas um delineado ao seu redor, proposto pelo contraste de uranila. Esses resultados ainda necessitam ser comparados aos testes com as variantes (sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA).

Resultados semelhantes foram observados no estudo de Valo et al. (2010), onde as nanopartículas de dipropionato de beclometasona (BDP) foram decoradas com hidrofobinas de classe II (HFBII), expressas por *Trichoderma reesei*. Neste estudo, também foi relatado a presença de vários pontos eletrodensos na superfície das nanopartículas de BDP-HFBII, os quais eles atribuem a presença de nanopartículas de ouro revestidas com proteína aderidas às NP de BDP-HFBII.

Como demonstrado anteriormente na figura 22 e nos estudos de Correa et al. (2020), as nanopartículas de PHB são ilustradas como aglomerados quando analisadas por MEV. Devido ao limite de resolução desta técnica, micropartículas de PHB foram utilizadas em substituição às nanopartículas para caracterizar morfológicamente a interação das proteínas com o polímero de PHB por MEV. As micropartículas foram sintetizadas seguindo o método de Quintanar-Guerrero (1998) e funcionalizadas pelas proteínas sfGFP-SBD, sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA. A preparação das amostras e os parâmetros de análises foram realizados conforme descrito na metodologia dos itens 4.4.1 e 4.4.3.

A figura 32 resume os resultados morfológicos obtidos em relação às análises de MEV-EDS após as nanopartículas serem funcionalizadas pelas proteínas.

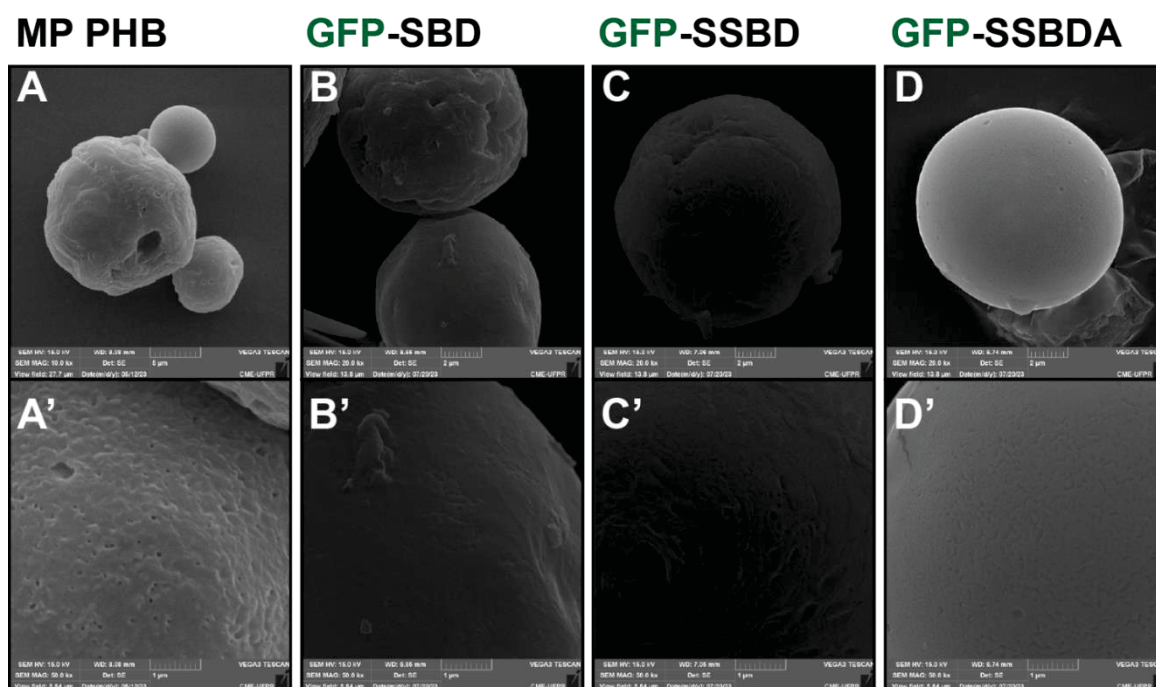


Figura 32. Imagens de MEV das micropartículas de PHB antes e após a funcionalização com sfGFP-SBD e suas variantes. Em A-A') micropartículas controle, antes da imobilização, em 5 μm e 1 μm , respectivamente. Em B-B') micropartículas funcionalizadas por sfGFP-SBD em 2 μm e 1 μm ; C-C') micropartículas funcionalizadas por sfGFP-sSBD em 2 μm e 1 μm ; D-D') micropartículas funcionalizadas por sfGFP-sSBDA em 2 μm e 1 μm .

As análises de MEV das micropartículas controle (A e A'), antes da submissão à funcionalização, corroboram que a estrutura do polímero é esférica e maciça, apresentando morfologia irregular em sua superfície, com várias rugosidades e porosidades. Seu diâmetro é aproximadamente em torno de 10 μm . As amostras que foram incubadas com as proteínas (B, B', C, C', D e D') não apresentam diferença significativa na morfologia, porosidade ou espectro de dissipação de raios-X (EDS), o que é compreensível pela diferença de tamanho das micropartículas com as proteínas. Outro ponto importante é a diferença de área superficial disponível ofertada pelas micropartículas, onde o ponto de saturação das proteínas nas nanopartículas é diferente da concentração das proteínas necessárias para saturar a superfície das micropartículas.

De modo geral, embora o uso de micropartículas para as análises de MEV elucidaram alguns detalhes referentes à morfologia do polímero com mais detalhes, é necessário ainda

investigar se esse comportamento também se reflete às nanopartículas. Vale ressaltar também que a metodologia utilizada para sintetizar as micropartículas é diferente da utilizada para a síntese de nanopartículas. Na metodologia de Quintanar-Guerreiro et al., as micropartículas são sintetizadas pelo método de emulsão, onde a taxa de mistura, a quantidade de polímero e de surfactante exercem papéis essenciais no tamanho das micropartículas. Na metodologia de Shakeri et al. (2014), por outro lado, a quantidade de água em diálise e o tamanho dos poros da membrana é que exercem funções essenciais para a quantidade e tamanho das nanopartículas. Diante disso, esses resultados também precisarão ser analisados posteriormente com mais detalhes para as nanopartículas.

5.8 Caracterização morfológica das nanopartículas funcionalizadas por proteínas recombinantes por Microscopia Confocal (CM)

Foram também realizadas análises, em diferentes ampliações, de microscopia confocal envolvendo as micropartículas funcionalizadas. Essa técnica em especial foi realizada para responder o padrão de distribuição das diferentes proteínas fluorescentes na superfície da nanoesfera. Entretanto, devido ao limite de escala da técnica, como descrito para as análises de MEV, as micropartículas também foram utilizadas em substituição às NPs para determinar morfológicamente o padrão de adsorção aparente das diferentes *tags* com o polímero de PHB, o que pode corroborar algumas informações obtidas nos testes de funcionalização. Os ensaios foram realizados conforme a metodologia descrita no item 4.4.7 e seus resultados foram mostrados na figura 33.

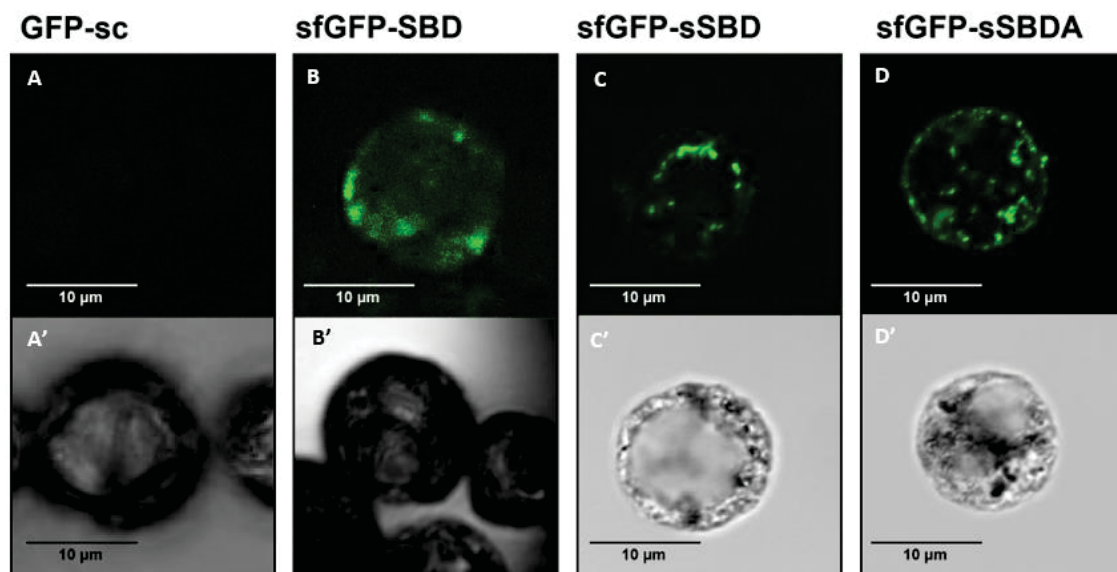


Figura 33. Imagens de Microscopia Confocal das micropartículas funcionalizadas. Em A e A', imagens as micropartículas funcionalizadas com sfGFP sem cauda, em campo escuro para detecção de fluorescência e campo claro, respectivamente. Em B e B', imagens as micropartículas funcionalizadas com sfGFP-SBD, em campo escuro e campo claro, respectivamente. Em C e C', imagens as micropartículas funcionalizadas com sfGFP-sSBD, em campo escuro e campo claro, respectivamente. Em D e D', imagens as micropartículas funcionalizadas com sfGFP-sSBDA, em campo escuro e campo claro, respectivamente. Escala: 10 µm.

Todas as imagens foram obtidas a 10 µm, na mesma escala de tamanho das micropartículas, como observado em MEV. Em todas as imagens de campo claro (A', B', C' e D'), observa-se o mesmo comportamento e morfologia já descritos para as micropartículas em MEV. Entretanto, o campo escuro possibilitou rastrear as proteínas devido ao carácter fluorescente da sfGFP e permitir comparar os padrões de adsorção das proteínas na superfície das micropartículas de PHB. Nota-se também os pontos eletrodensos na superfície irregular das nanopartículas as figuras de campo claro (C' e D'), que, quando comparados às suas imagens espelho no campo escuro (C e D), correspondem às regiões com fluorescência.

Comparando os campos escuros (A, B, C e D), nota-se que apenas as micropartículas tratadas com proteínas fluorescentes com caudas SBD e variantes (B, C e D) aparecem no campo escuro, em detrimento das micropartículas tratadas com sfGFP (A), a qual não possui cauda de afinidade. Esse resultado já era esperado visto que sfGFP trata-se como controle negativo neste trabalho e suas interações de adsorção são inespecíficas, sendo desorvidas já na etapa de lavagem. Na análise dos tratamentos B, C e D, nota-se que a fluorescência das proteínas é estritamente relacionada à sua superfície, sugerindo o que já foi mencionado anteriormente sobre o carácter de nanoesfera.

Adicionalmente, também pode ser apontado que não há diferenças significativas aparentes nos tratamentos envolvendo a imobilização das proteínas variantes (C e D). Nota-se um comportamento de imobilização heterogêneo, em sítios e regiões específicas na superfície da micropartícula, em detrimento do comportamento de adsorção mais homogêneo e difuso visto pela proteína sfGFP-SBD (B), apresentando traços de fluorescência no meio ao redor das micropartículas. Entretanto, este resultado é apenas qualitativo, necessitando de medidas quantitativas de fluorescência para determinar diferenças de afinidade e força de adsorção das variantes com a micropartícula.

Vale novamente ressaltar que este ensaio é baseado na imobilização de proteínas em micropartículas. O ponto de saturação das proteínas na superfície do polímero é significativamente afetado em função da área superficial disponível das micropartículas ($A_{mp} = 314.000 \mu\text{m}^2$), em detrimento da área das nanopartículas ($A_{np} = 196,25 \mu\text{m}^2$). Dessa forma, os resultados aqui obtidos não podem ser comparados diretamente com os resultados dos ensaios de saturação e das isotermas discutidas no item 5.5, as quais utilizaram nanopartículas em sua formulação. O que se permite inferir entre esse e outros ensaios é apenas nas diferenças de afinidade entre as *tags* com o PHB, mas não necessariamente com a efetividade de imobilização, o que vai de encontro com os dados observados pelo ensaio de dessorção das proteínas na superfície das nanopartículas (item 5.9).

Apesar do exposto, os resultados de microscopia confocal concluem que as proteínas contendo caudas SBD e variantes imobilizam a superfície das micropartículas de PHB, em detrimento da proteína sfGFP sem cauda, mas que diferenças de afinidade e ponto de saturação entre elas não são possíveis determinar. Além disso, a técnica permitiu inferir na heterogeneidade da superfície e nos diferentes sítios de energia de adsorção que o polímero fornece para a imobilização das proteínas. Por esse motivo, como foi visto no item 5.5, a isoterma de Freundlich foi utilizada para modelar a eficiência de imobilização das proteínas, uma vez que uma das premissas desta isoterma é que a superfície do suporte adsorvente apresenta sítios específicos de energias diferentes em sua superfície, sendo predominantemente heterogênea.

5.9 Caracterização topográfica das nanopartículas funcionalizadas por Microscopia de Força Atômica acoplada a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (AFM-FTIR)

Para caracterizar topograficamente as nanopartículas funcionalizadas, foram realizados testes em microscopia de força atômica acoplado à espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (AFM-FTIR). Esses ensaios foram realizados no CNPEM (Campinas, SP), como indicado no item 4.4.8. Os resultados são apontados na figura 34.

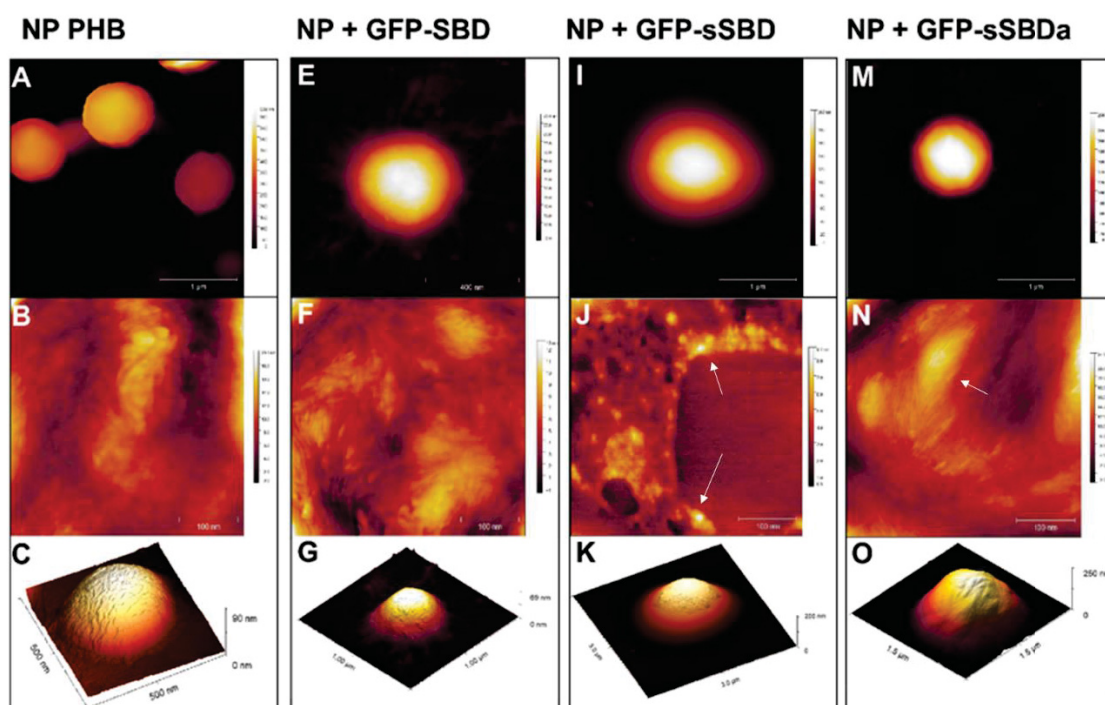


Figura 34. Imagens topográficas de AFM das nanopartículas de PHB antes e depois da funcionalização. Em A, E, I e K: ilustram as imagens topográficas das nanopartículas de PHB, nanopartículas funcionalizadas por sfGFP-SBD, por sfGFP-sSBD e por sfGFP-sSBDA, respectivamente, todas a 1 μm . Em B, F, J e N: imagens ampliadas em 100 nm de uma nanopartícula controle, uma funcionalizada por sfGFP-SBD, por sfGFP-sSBD e por sfGFP-sSBDA, respectivamente. Em C, G, K e O: modelos tridimensionais das nanopartículas controle, funcionalizadas por sfGFP-SBD, por sfGFP-sSBD e por sfGFP-sSBDA, respectivamente. As setas brancas indicam locais de topografia elevada em padrão heterogêneo, sugerindo a presença de proteínas.

A técnica de AFM é útil por permitir mapear as superfícies dos materiais quanto à sua topografia, elasticidade e plasticidade, fornecendo imagens em resolução atômica através de forças de atração ou repulsão entre os átomos da superfície da amostra e da sonda que varre a área amostral. Neste sistema piezoelétrico, a sonda de dimensões nanométricas é presa a um braço flexível (*cantilever*) responsável pela transmissão do sinal. À medida que a sonda

percorre a superfície da amostra, nas posições x, y e z com precisão de décimo de Ångstrom, ocorre a deflexão e ou torção do *cantilever* que é detectada por um feixe de laser apontado na outra extremidade dele. A reflexão do laser é direcionada em um fotodiodo que detecta os movimentos do *cantilever*. As medidas de comprimento e diâmetro obtidas são coletadas e analisadas através do software do equipamento, o qual reconstrói as informações em uma imagem bidimensional ou tridimensional da amostra. Esta deflexão é proporcional à força de interação entre a sonda e a superfície (SANTOS; CASTANHO, 2004).

Nesta técnica, regiões mais escuras nos mapas amplificados representam regiões de menor topografia na amostra, uma vez que estas exercem menos efeito piezoelétrico em relação à elevação vertical do sensor durante o processo de *scanning*. Em contrapartida, regiões mais claras no mapa correspondem a regiões mais elevadas da amostra, que exercem maior pressão ao sensor durante a varredura. Sendo assim, nas imagens J e N, as quais mostram as regiões ampliadas a 100 nm de NP-sfGFP-sSBD e NP-sfGFP-sSBDA, respectivamente, pode ser visualizado regiões pontuais mais claras, com padrão heterogêneo, indicado pelas setas brancas, com certo contraste em relação à cor geral de sua superfície, representado por cores mais escuras. Esse padrão não é aparente no mapa das imagens B e F, que representam regiões ampliadas a 100 nm de nanopartículas controle e funcionalizadas por proteína sfGFP-SBD, respectivamente.

As imagens A, E, I e M (figura 34), em contrapartida, com menor ampliação (1 μm), representam claramente um contraste de regiões escuras e intermediárias, o que permite confirmar a presença de irregularidades naturais do polímero na superfície das nanopartículas, como já comentado nos resultados de MET.

Esses dados sugerem uma possível incerteza sobre presença de proteínas adsorvidas nessas regiões, uma vez que a distribuição uniforme de regiões pontuais mais claras no mapa pode estar vinculada à característica tanto de irregularidade natural do polímero quanto à presença de proteínas adsorvidas em sua superfície, que não é visto nos mapas A e B (controle). Para obter dados mais precisos, foram analisados os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das amostras, quando acopladas a AFM (figura 35).

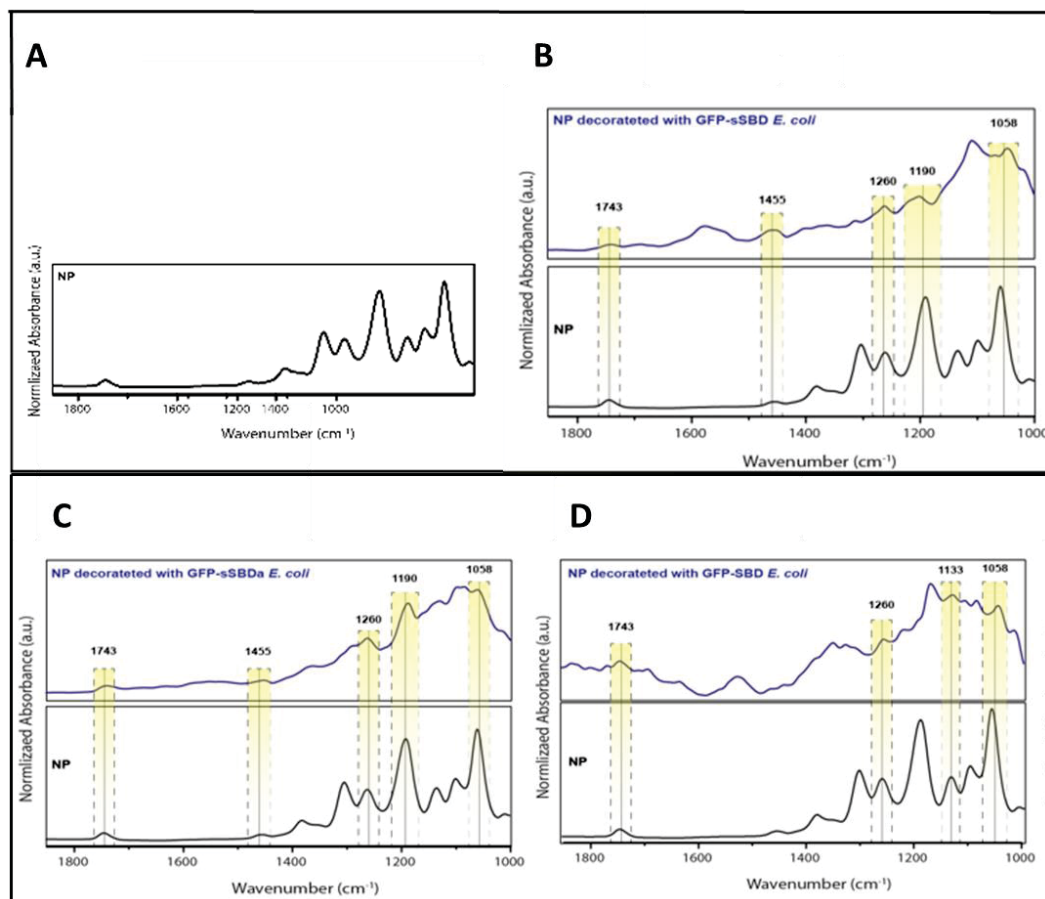


Figura 35. Imagens do espectro de FTIR acoplado à AFM das nanopartículas antes e após funcionalização com proteínas fluorescentes. Em A é visualizado o espectro infravermelho de uma nanopartícula de PHB controle. Em B o espectro de uma nanopartícula funcionalizado por sfGFP-sSBD. Em C o espectro para nanopartícula funcionalizada por sfGFP-sSBDA e em D é referente ao espectro infravermelho de nanopartícula funcionalizada por sfGFP-SBD.

Na técnica de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), um feixe de radiação infravermelha aplicada na amostra excita as transições vibracionais das moléculas, permitindo que o detector quantifique a intensidade de absorção da radiação no espectro do infravermelho e meça o comprimento de onda emitido pela amostra (YANG et al., 2015). A intensidade de absorção de uma molécula é proporcional a quantidade de grupos funcionais que ela apresenta. Além disso, a intensidade de absorção também aumenta com o aumento da polaridade das ligações vibratórias contidas nela. As proteínas apresentam muitas ligações polares que contribuem para absorção de diferentes faixas do infravermelho, cujas faixas mais características às ligações peptídicas e das cadeias principais já bem caracterizadas (BARTH, 2007). Por essa razão, essa técnica tem sido muito utilizada para identificar proteínas em amostras, determinar suas estruturas secundárias e até prever a formação de agregados (MILLER, BOURASSA, SMITH, 2013).

O espectro do infravermelho se estende de 0,78 μm a cerca de 1.000 μm . Para determinar a presença das proteínas adsorvidas nas nanopartículas e confirmar as informações obtidas nos ensaios de AFM, foram comparados os espectros de infravermelho das amostras contendo apenas o PHB (quadros sempre abaixo) com os espectros da nanopartícula contendo proteína (quadros superiores). Os espectros apenas das proteínas sem nanopartículas não puderam ser estimados, uma vez que a concentração muito diluída das proteínas atingiu a concentração máxima de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e, segundo Yang et al. (2015), o limite de detecção do espectro de proteínas não deve ser inferior a 3 mg/mL .

Dessa forma, as regiões hachuradas em amarelo no espectro das figuras representam os picos de absorvância dos grupos funcionais de PHB (A), que ocorrem em comum em todos os espectros. Esses picos observados (1743, 1260, 1190 e 1058 cm^{-1}) foram similares aos picos esperados para PHB, descritos na literatura, sendo 1728 e 1725 cm^{-1} relacionados ao grupo carboxílico; 1270 cm^{-1} o pico referente à ligação C=O e o pico 1044 cm^{-1} referente ao grupo COC (SAMROT et al., 2021).

É possível notar também a presença de picos de absorção que não correspondem aos picos de PHB, o que sugere, por exclusão, que sejam referentes aos picos de absorção advindos das proteínas. Esses picos são de aproximadamente 1590/1580 cm^{-1} para sfGFP-sSBD (B), um leve pico de aproximadamente 1000 cm^{-1} para sfGFP-SBDA (C) e um de aproximadamente 1520, 1330 e 1126 cm^{-1} para sfGFP-SBD (D). Esses dados estão fortemente relacionados à presença dos grupos amida II (1.550 cm^{-1}), que são vibrações emitidas das ligações CN e NH, e amida III (1.300 cm^{-1}) das cadeias polipeptídicas em geral (MILLER, BOURASSA, SMITH, 2013; YANG et al., 2015), o que sustenta que as regiões claras nas figuras de AFM podem indicar a presença das proteínas adsorvidas.

5.10 Caracterização física da funcionalização das nanopartículas de PHB por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)

Existem diferentes técnicas de caracterização física que podem ser utilizadas para corroborar as informações morfológicas extraídas das nanopartículas a partir das técnicas de microscopias eletrônicas ou confocal, como diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e polidispersidade da amostra. A maioria dessas estratégias foram realizadas através dos ensaios de DLS (*Dynamic Scattering Light*) das nanopartículas controle e funcionalizadas por

proteínas. A metodologia para a realização do ensaio foi descrita no item 4.4.2. Os resultados das análises de DLS para as proteínas sfGFP-SBD, sfGFP-sSBDA e sfGFP-sSBD estão apresentados nas figuras 36 e 37.

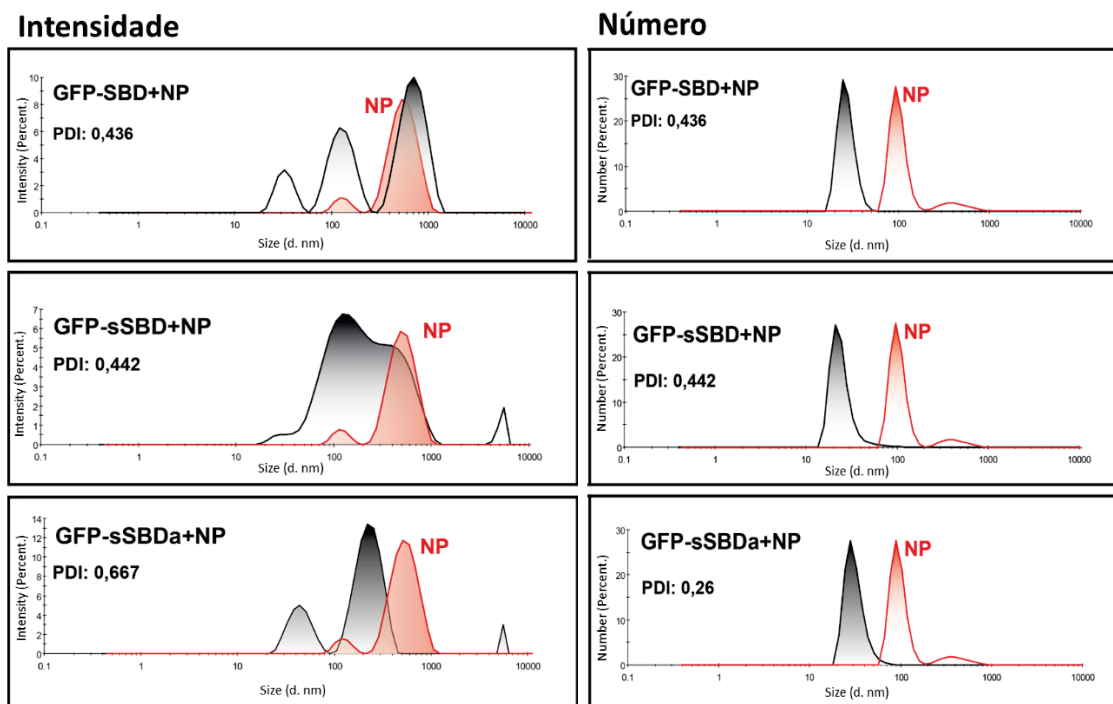


Figura 36. Análise de diâmetro hidrodinâmico e polidispersão por DLS das nanopartículas antes e após a imobilização. São apresentados o diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das nanopartículas controle (histogramas hachurados em vermelho) e funcionalizadas (histogramas hachurados em escuro), tanto em número quanto em intensidade de sinal.

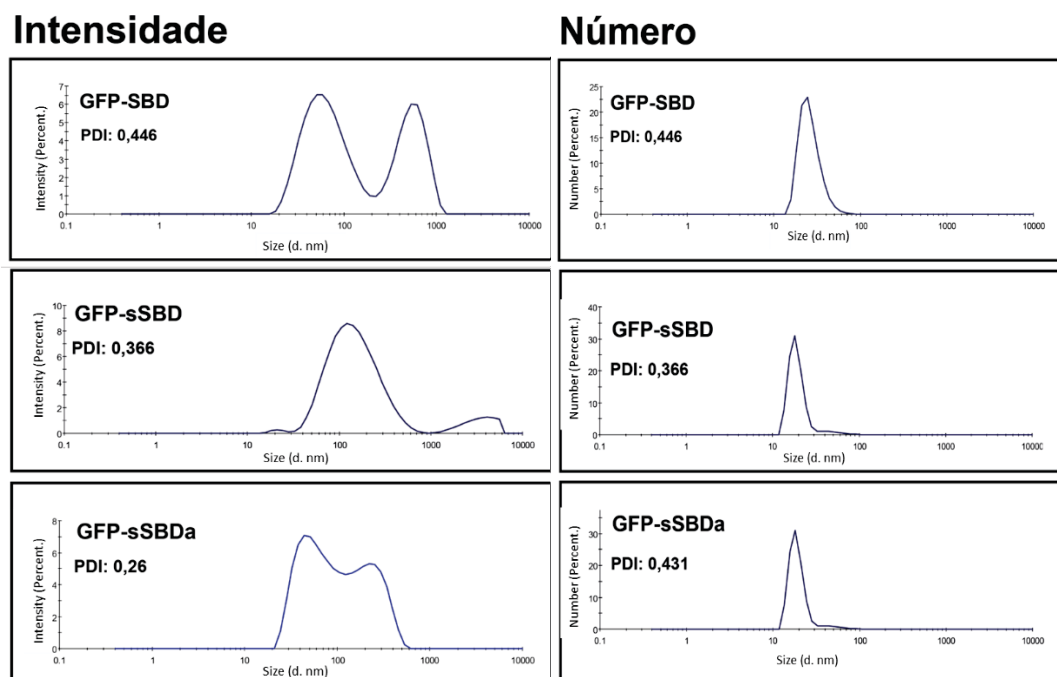


Figura 37. Análise de diâmetro hidrodinâmico e polidispersão por DLS das proteínas sfGFP-SBD e sfGFP-sSBD em meio tamponado. São apresentados o diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das proteínas sfGFP-SBD, sfGFP-sSBDa e sfGFP-sSBD em meio tamponado (pH 8,0), tanto em número quanto em intensidade de sinal.

Os dados de DLS para determinação do tamanho das nanopartículas controle foi entre 100 e 300 nm (histograma em vermelho, quadro à direita, figura 36). Esses dados corroboram as informações obtidas nas análises morfológicas de MET para as NPs controles, as quais foram apresentadas anteriormente acusando um tamanho médio de aproximadamente 200 nm. Nota-se também um comportamento de agregação das nanopartículas, mesmo em meio tamponado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0), o que resulta em um pico de intensidade em aproximadamente 600 nm, referente ao grande diâmetro do agregado (histograma vermelho no quadro de intensidade, figura 36). Esse resultado é corroborativo ao que foi encontrado nas imagens de MEV a 1 μm das nanopartículas (figura 22), onde foi visualizado a presença de agregados de nanopartículas.

Vale ressaltar que na comparação entre os histogramas de diâmetro hidrodinâmico em intensidade e número individual de NPs controle, não se observa a presença do pico de 600 nm que corresponde ao comportamento de agregação no histograma de número, o que significa que, em número, o perfil de agregação representa uma população muito pequena, a qual é dominada pela população dispersa, com diâmetro entre 100-300 nm. Além disso, o tamanho das nanopartículas é diretamente influenciado pela técnica adotada para sua síntese. Dessa forma, a nanodiálise utilizada nesta pesquisa obteve resultados semelhantes no que diz respeito

ao tamanho (100-200 nm), carga (negativa), morfologia (esférica e com agregação) e distribuição das nanopartículas preparadas por nanodálise e nanoprecipitação no estudo inicial de Shakeri et al. (2014).

Analisando os histogramas das proteínas em meio tamponado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e NaCl 50 mM), verifica-se que para ambas ocorre também o comportamento de agregação (figura 37), mesmo quando diluídas. Esse comportamento é visualizado pelos elevados picos de 20 e 50 nm para as três proteínas, no histograma em número. Esse resultado corrobora as informações obtidas pela análise de SAXS, apresentado no item 5.11. Os valores de polidispersidade das proteínas sem nanopartículas foram 0,366 para sfGFP-sSBD e 0,446 para sfGFP-SBD.

Quando as proteínas, em concentração saturante (15 μ g), são imobilizadas nas NPs (histogramas com sobra escura, figura 36), é observado, para ambas as proteínas, apenas os picos de 50 nm, os quais correspondem ao diâmetro de agregação das proteínas em solução. Observa-se também o pico de 100 nm, referente às nanopartículas livres. Esses dados não apresentam diferença significativa em relação à funcionalização com sfGFP-SBD e sfGFP-sSBD. Entretanto, em intensidade, por outro lado, é possível perceber a presença de picos de 50, 100 e aproximadamente 700 nm no tratamento com sfGFP-SBD, os quais correspondem às intensidades de agregação de proteína-proteína, nanopartícula livre e nanopartícula agregada. Já no tratamento com sfGFP-sSBD, observa-se apenas os picos de 100 nm e 600 nm, os quais são referentes ao tamanho das nanopartículas livres e agregadas, porém, não se pode afirmar o estado de funcionalização das mesmas levando apenas em consideração esse ensaio.

Esses dados resumem, portanto que, em número, a população de ambos os agregados proteicos domina o perfil, quando misturadas nanopartículas e proteínas. Numericamente, os dados apontam que existem poucas nanopartículas em comparação com as proteínas livres e agregadas. Em intensidade, a mistura de nanopartícula imobilizada com sfGFP-SBD e com sfGFP-sSBD não revela alterações significativas de diâmetro devido à enorme polidispersão das proteínas no meio (0,436 e 0,442, respectivamente). Sendo assim, será necessário repetir o experimento em DLS, acoplado ao goniômetro, e em concentrações não saturantes de proteínas para verificar se há diferença significativa no diâmetro das nanopartículas imobilizadas com sfGFP-SBD e com sfGFP-sSBD.

Outra característica importante para caracterizar e utilizar nanopartículas é o potencial zeta. O potencial Zeta pode ser definido como a carga elétrica superficial ao redor da interface

com a nanopartícula. A carga líquida nativa da nanopartícula interage diretamente com uma camada de íons de carga oposta em sua superfície, derivados da solução em que a nanopartícula se encontra. Essas interações eletrostáticas entre os íons e a carga da nanopartícula foram uma dupla camada elétrica, a qual pode ser mensura pela diferença de potencial elétrico entre a camada de íons adsorvida eletrostaticamente à carga nativa oposta da nanopartícula (SAMROT et al., 2021). Essa diferença de potencial elétrico é denominada de potencial zeta, a qual é utilizada para estimar a estabilidade da NP, bem como inferir sobre sua carga superficial, que é extremamente relevante no contexto citotóxico de uma vacina e sua incorporação pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (CHEN et al., 2019).

Juntamente com as análises físicas por DLS, também foi realizado no Zeta Sizer, os experimentos de potencial zeta das proteínas e nanopartículas, conforme a metodologia exposta no item 4.4.2. Os resultados de potencial zeta são demonstrados na tabela 9 abaixo.

Tabela 9. Potencial Zeta das nanopartículas funcionalizadas

NP	sfGFP-SBD	sfGFP-SBD + NP	sfGFP-sSBD	sfGFP-sSBD + NP
-19±0,5	-11±1,5	-12±1,2	-12±0,1	-11±0,7

Os dados apontam que a nanopartícula sozinha apresenta um potencial zeta de -19 mV. Entretanto, após a sua funcionalização com a proteína sfGFP-SBD, que apresenta potencial zeta intrínseco de -11 mV, seu potencial aumentou para -12 mV. Em contrapartida, após a imobilização com a proteína sfGFP-sSBD (-12 mV), nota-se um comportamento semelhante, onde o potencial zeta da nanopartícula funcionalizada também aumentou para -11 mV, com desvio de 0,7. Entre as proteínas, percebe-se que não houve diferenças significativas nos seus resultados de potencial zeta. A análise de potencial zeta da proteína sfGFP-sSBDA e funcionalizada na nanopartícula não foram realizadas até a data presente.

Entretanto, esses resultados indicam levemente uma menor estabilidade da nanopartícula após a sua funcionalização, para ambas as proteínas. Segundo Lee et al. (2011), valores extremos de potencial zeta, positivos ou negativos, implicam na maior estabilidade da nanopartícula em suspensão, uma vez que cargas superficiais opostas tendem a repelir as nanopartículas vizinhas em suspensão, impedindo o comportamento de agregação. Como o potencial zeta depende diretamente do método de formulação, deve ser considerado que os elementos necessários para síntese de nanopartícula podem ter influenciado de alguma forma

na carga superficial da nanopartícula e, portanto, no seu comportamento de agregação, visualizado nos ensaios de DLS e MEV.

Em alguns estudos, a participação do solvente utilizado na fase orgânica da formação das nanopartículas pode influenciar diretamente tanto no tamanho quanto na carga das nanopartículas. No estudo de Maia et al. (2004), micropartículas de PHB-PHV, preparadas pela técnica de emulsão, tiveram diminuição dos seus potenciais zeta quando comparadas as preparações com e sem surfactante (PVE), de - 8 mV a - 18 mV, respectivamente. Entretanto, neste estudo, o TFE foi o solvente orgânico utilizado para sintetizar as nanopartículas pelo método de diálise e, nas análises de EDS, por exemplo, não foi detectado traços desse composto após a diálise. O mesmo composto foi também utilizado para síntese de nanopartículas de PHB, proposto inicialmente por Shakeri et al. (2014), como mencionado anteriormente. Seus resultados convergiram com os resultados desta pesquisa, uma vez que o tamanho e carga das suas nanopartículas sem funcionalização foram 140 nm e potencial zeta de -18 mV, respectivamente.

Isso sugere que o método de nanodiálise utilizado em ambos os estudos foi eficaz ao proporcionar tamanhos satisfatórios de nanopartícula (140-200 nm). Entretanto, quanto à estabilidade, as nanopartículas preparadas por nanodiálise apresentam populações visíveis de agregação por MEV e DLS e pequenas irregularidades em sua superfície, com potencial zeta inferior (-19 mV) ao potencial zeta de nanopartículas de PHB produzidas pela técnica de nanoprecipitação (SHAKERI et al., 2014). Apesar da estabilidade, a carga residual das nanopartículas com e sem proteínas não foi alterada para valores positivos, o que é satisfatório para ambas as condições de importação e citotoxicidade. Segundo Chen et al. (2019), para produção de vacinas, é vantajoso que nanopartículas apresentem carga superficial negativa, pois ela apresenta fácil e rápida importação pelas células dendríticas.

5.11 Análise de agregação das proteínas recombinantes por SAXS

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo é um método utilizado para caracterizar o tamanho e a conformação geral de proteínas em uma solução, permitindo determinar seu status de ordenação ou desordenação a uma resolução entre 50 e 10 Å (FEIGIN; SVERGUN, 1987; PUTNAM et al., 2007). Esta técnica também pode fornecer informações importantes sobre massa molecular, raio de giro, volume da proteína, interações proteína-proteína, organização

espacial dos domínios proteicos, estados de oligomerização e agregação e monitoramento em tempo real de mudanças conformacionais relacionadas à função (TSUTAKAWA et al., 2007; ZHANG et al., 2022).

A técnica consiste na exposição de uma solução de proteínas e de uma solução controle (apenas buffer) a um feixe colimado de raios-X. A intensidade de luz espalhada é registrada em função do ângulo de espalhamento 2θ por detectores bidimensionais e a subtração do espalhamento observado para a solução de proteínas em relação ao tampão resulta em um padrão de espalhamento, fornecido apenas pela macromolécula (BERNADÓ; SVERGUN, 2011). Para os estudos estruturais, esta diferença deve ser superior a três ordens de magnitude para gerar dados com precisão adequada (PUTNAM et al., 2007).

As soluções de proteínas de modo geral são consideradas como soluções monodispersas, ou seja, as proteínas apresentam movimentação aleatória em solução. O espalhamento de luz desse tipo de solução, em geral, possui um comportamento isotrópico e proporcional ao espalhamento de uma única partícula média, calculada em relação a todas as orientações adotadas possíveis (FEIGIN; SVERGUN, 1987; BERNADÓ; SVERGUN, 2011). Esse padrão de espalhamento obtido pela solução é detectado pelos detectores e submetido a uma média circular, cuja intensidade do espalhamento (I) que se deseja descobrir, dado em unidades arbitrárias, é plotada em função logarítmica do vetor de espalhamento q^2 ($(4\pi \sin\theta)/\lambda$), dado em nm^{-2} , no eixo X, gerando uma curva unidimensional de espalhamento, conhecida como plot de Guinier (GUINIER; FOURNET, 1955). Sendo 2θ o ângulo de espalhamento utilizado, λ o comprimento de onda do raio X incidente na amostra, definidos no início do ensaio, e q uma relação inversa ao λ , o qual fornece informações sobre a resolução dos dados (KIKHNEY; SVERGUN, 2015).

A curva de espalhamento pode fornecer várias informações. A uma maior resolução, ou seja, menor o valor de q^2 , a intensidade de espalhamento (I) é dependente do formato da macromolécula. As proteínas estruturadas apresentam uma queda na intensidade em função de q^2 , relação conhecida como lei de Porods (PAUW, 2013). Para comprovar que as proteínas se agregam, conforme discutido no item 5.5, foi realizado um perfil de SAXS da proteína sfGFP-SBD, conforme demonstra a Figura 38.

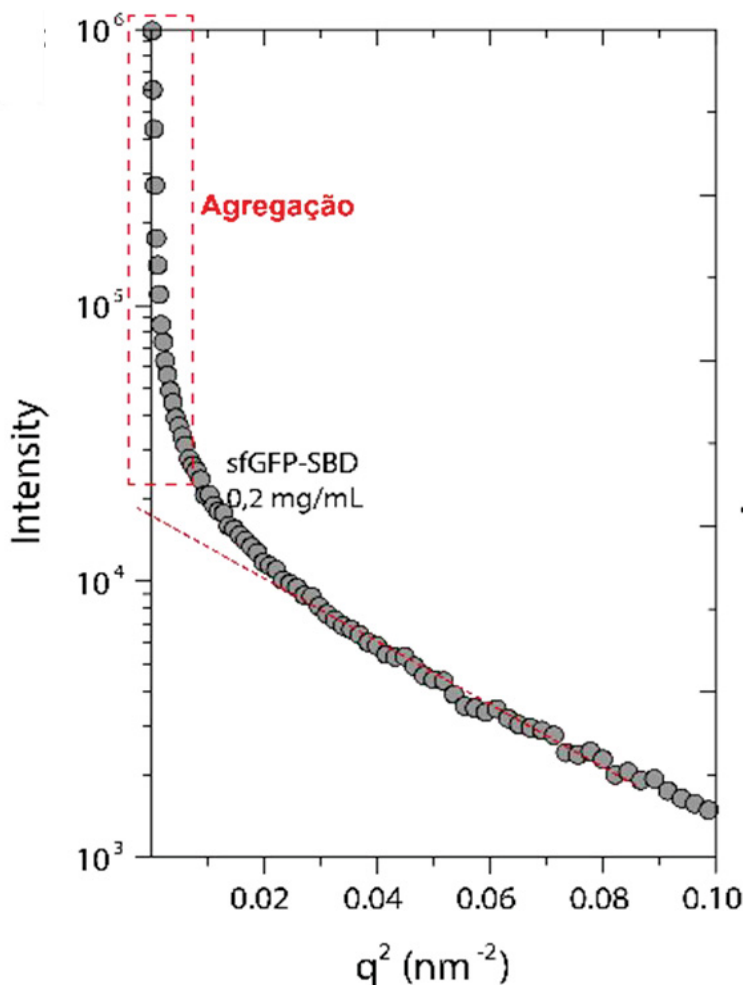


Figura 38. Análise por espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) da proteína sfGFP-SBD em solução. A figura mostra um comportamento de agregação da proteína sfGFP-SBD em solução de 0,2 mg/mL, a partir de uma intensidade de espalhamento de 10^5 , mesmo em $0,02 \text{ nm} < q^2$. No plot de Guinier, eixo Y = $\log(I)$, dado em unidades arbitrárias. Eixo X = q^2 , dado em nm^{-2} .

O resultado da curva indica que a formação de agregado possivelmente ocorre na uma intensidade de dispersão de 10^5 , ou seja, a uma intensidade elevada para um pequeno valor de q^2 . Segundo Ferreira et al. (2022), a curva de dispersão deve ocorrer em valores cujo q^2 seja menor que $0,2 \text{ nm}^{-1}$ para indicar a presença de estruturas individuais, como pequenas concentrações de nanopartículas ou altas concentrações de proteínas. Entretanto, uma clara alteração da curva, de modo não contínuo logaritmicamente, tendendo a aumentar abruptamente a curva para altos valores de $\ln(I)$ em baixos valores de q^2 indicam a formação de agregados. Esse mesmo resultado foi relatado no estudo de Ferreira et al. (2022) utilizando proteínas de proteínas corona em superfície de nanopartículas de sílica.

Esse resultado observado na figura 38 possivelmente pode estar relacionado às interações hidrofóbicas entre as caudas SBD das espécies monoméricas, uma vez que as três proteínas apresentam o mesmo comportamento na isoterma após 30 µg. Esses efeitos de agregação também são sugeridos nos ensaios de DLS das proteínas, que identificaram populações de 20 a 50 nm de diâmetro hidrodinâmico, os quais são considerados valores não padrão para diâmetros de proteínas monoméricas em solução.

Para confirmar essa hipótese, será necessário verificar se esse comportamento de agregação também se reflete na curva de SAXS para as proteínas sfGFP-sSBD, sfGFP-sSBDA e para sfGFP (controle negativo). Adicionalmente, uma análise por SEC e de eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida 12% em condição nativa/ não desnaturante são possíveis estratégias disponíveis que serão realizadas na sequência para corroborar mais assertivamente não só esses dados de SAXS de sfGFP-SBD, mas também para proteínas recombinantes com as variantes de SBD, com diferentes conteúdos de cisteínas.

5.12 Análise por SPR da interação das proteínas recombinantes ao PHB

A superfície de ressonância plasmônica (SPR) é uma técnica amplamente utilizada para estudar a cinética e a força de interação entre biomoléculas, permitindo elucidar e rastrear parceiros funcionais de ligação através de suas atividades específicas de ligante-receptor. A técnica consiste em imobilizar uma molécula receptora alvo em específico à superfície do sensor, acoplado a um detector quimio-transdutor. Ao passar uma solução contendo possíveis ligantes de interesse, a interação biomolecular do ligante e do receptor pode ser detectada pelo sensor devido ao aumento do ângulo de reflexão de um feixe de luz sobre a camada de superfície plasmônica do sensor onde está imobilizado o receptor. Assim, o processo de associação e dissociação/lavagem pode ser analisado em tempo real na ausência de um marcador (WAMMES et al., 2013).

Dessa forma, para determinar as diferenças de afinidade entre as tags pelo PHB, conforme descrito na metodologia do item 4.4.9, o PHB foi imobilizado *overnight* sobre o sensor de ouro. Posteriormente, as soluções das proteínas apresentando cauda SBD foram introduzidas no sistema por 5 min, e, finalmente foi introduzida a lavagem (etapa de dissociação). Os resultados são apresentados na Figura 39.

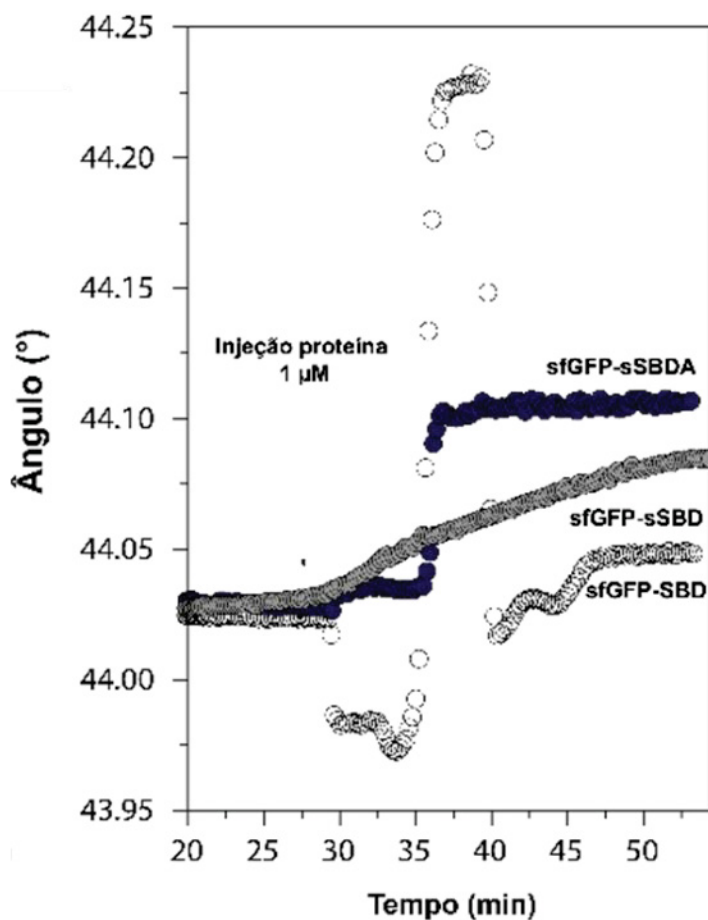


Figura 39. Análise por SPR das nanopartículas de PHB funcionalizadas pelas proteínas recombinantes. A curva em cinza claro representa as interações de sfGFP-SBD com o polímero; a curva em cinza escuro representa a interação da sfGFP-sSBD com o polímero e a curva em azul representa a interação de sfGFP-sSBDA pelo polímero.

A análise de SPR indica dois resultados preponderantes: todas as três proteínas apresentam o comportamento de adsorção ao PHB, o que significa que a redução do tamanho das caudas e do conteúdo de Cys nas proteínas variantes não afetam a funcionalidade primária da cauda em imobilizar na nanopartícula, pois elas continuam funcionais. Esses dados corroboram os dados visualizados nas imagens de microscopia confocal (figura 33) com as micropartículas de PHB e com os ensaios de saturação, em detrimento da proteína controle (sfGFP).

Outra conclusão do ensaio de SPR está na diferença de afinidade das tags em relação ao polímero imobilizado no sensor. Após as soluções de proteínas serem inseridas no sistema sob fluxo contínuo por 5 minutos (tempo 25 min no gráfico), nota-se que, embora as 3 proteínas

imobilizem no PHB, o comportamento de adsorção das nanopartículas nos períodos seguintes de lavagem/dissociação (minuto 30) são contrastantes. A sfGFP-SBD apresenta grande variação de adsorção após o minuto 30, perdendo sinal de detecção nos minutos iniciais e posteriormente aumentando até o minuto 40, na fase de dissociação, onde o sinal começa a se manter constante até o final do ensaio. Já a sfGFP-sSBD apresenta um crescimento constante de sinal ao polímero durante todo o ensaio, de forma lenta, mesmo na presença da etapa de lavagem. Por fim, a proteína sfGFP-SBDA desenvolveu um comportamento mais estável frente as demais, uma vez que após o minuto 40, seu sinal de imobilização ao sensor se manteve constante e relativamente maior que o sinal das demais proteínas até o final do ensaio. Dessa forma, avaliando o ponto final, a sfGFP-sSBDA aparenta, pelo ensaio de SPR, maior afinidade ao PHB, seguido da sfGFP-sSBD e, por fim, a sfGFP-SBD.

Esses resultados contrastam com os dados obtidos pelo teste de saturação e pela isoterma, pelos dados de densitometria, pelo ensaio de dessorção e com os dados obtidos no estudo de Hiraishi et al. (2010), o qual utiliza 3 variantes da tag SBD de *R. pickettii* T1 para avaliar o potencial de afinidade ao PHB. Neste ensaio, a variante contendo uma Cys adicional na cauda (S445C) apresentou o melhor desempenho no ensaio de SPR, apresentando um rápido sinal resposta na fase de associação e lenta queda de sinal na fase de dissociação, em relação às demais.

Ensaio mais precisos de quantificação de interação entre o PHB imobilizado e as diferentes tags das proteínas contendo cauda SBD tornam-se necessários para elucidar melhor este dado. Embora os resultados tenham sido obtidos por AFM, Fujita et al. (2005) estimou que a força de interação entre PHB e SBD de PhaZ de *R. pickettii* é de aproximadamente 100 pN. Sendo assim, nos experimentos futuros, espera-se confirmar esse dado e comparar entre as proteínas recombinantes com tags variantes de SBD através de experimentos de força de interação acoplado a AFM ou SPR.

Adicionalmente, nos próximos passos, serão também investigados a interação entre as tags das proteínas recombinantes ao PHB por meio de um ensaio de ELISA indireto, a ser realizado em placa e em microtubo contendo macropartículas de PHB. Esses ensaios previstos pretendem elucidar melhor a diferença de afinidade entre as tags, confirmar dados já estabelecidos pelos ensaios de dessorção, isoterma e densitometria de banda e comparar com os dados contrastantes obtidos nos ensaios de SPR.

5.13 Análise de dessorção das proteínas recombinantes das nanopartículas funcionalizadas

A dessorção é um processo natural que ocorre em moléculas adsorvidas em determinadas superfícies. Ela segue as mesmas leis termodinâmicas comentadas anteriormente, envolvendo isothermas de adsorção. Para imobilizações de adsorção física que são específicas, como ocorre com as caudas SBD, e tratando-se que a superfície do polímero é irregular e apresenta sítios com energias logaritmicamente diferentes, o processo de dessorção deve ser introduzido no sistema.

Para analisar o comportamento de dessorção das diferentes *tags* utilizadas neste estudo a partir do ponto em que a superfície das nanopartículas é saturada pelas proteínas recombinantes, foi realizado um teste de dessorção das proteínas das nanopartículas com um gradiente do detergente neutro Triton X-100, como indicado no item 4.4.11. Este teste possibilita estimar as intensidades de imobilização das diferentes etiquetas de fusão, uma vez que a presença de uma substância anfipática como o Triton X-100 pode exercer um bom potencial competidor entre as caudas SBD com a superfície de PHB, onde a interação é majoritariamente hidrofóbica.

O ensaio, realizado em triplicata, basicamente consistiu na mistura de nanopartícula na concentração final de 0,02 mg/mL com as diferentes proteínas nas suas concentrações saturantes, identificadas no teste de saturação. No caso, cada tratamento recebeu 15 µg de proteína (sfGFP, sfGFP-SBD, sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA). Após o tempo de incubação (aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente), as nanopartículas foram centrifugadas e o sobrenadante (FNL) foi transferido para novos microtubos, com sua respectiva leitura de fluorescência (100 µL). O *pellet* de nanopartícula funcionalizada com 15 µg de proteína foi ressuspensão por uma solução tampão contendo uma concentração mínima de Triton-X (TrisHCl 50 mM, pH 8.0; NaCl 150 mM; TritonX-100 0,1%). A ressuspensão foi centrifugada novamente e o sobrenadante lavado (fração desligada ou FDL) por 0,1% de TritonX-100 foi lido no leitor de microplaca (100 µL) para detectar a intensidade de fluorescência correspondente à quantidade de proteína que desligou da nanopartícula após baixa concentração de detergente. Etapas subsequentes de lavagem foram realizadas da mesma forma, utilizando um gradiente maior de Triton-X, que variou de 0,5% a 6% nos buffers de lavagem. A figura 40 mostra as principais conclusões desse teste.

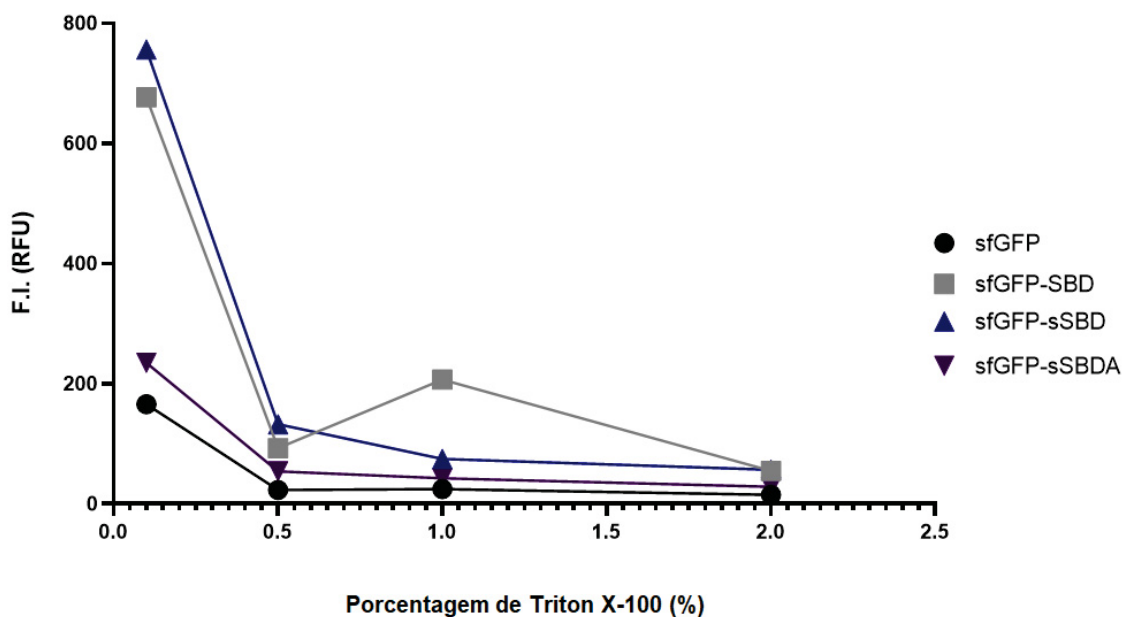


Figura 40. Teste de dessorção das diferentes proteínas recombinantes em nanopartículas de PHB a partir de 0,1% de Triton X-100. No eixo Y, a intensidade de fluorescência (*Fluorescence Intensity*), dada em RFU, das proteínas desligadas da nanopartícula, presentes no sobrenadante após cada etapa de lavagem utilizando diferentes tampões contendo Triton-X100. No eixo X, a porcentagem do detergente Triton-X100 (%) usado em diferentes concentrações nos tampões de lavagem, (0,1; 0,5; 1; 2; 4 e 6%), sendo os dois últimos pontos omitidos do gráfico por clareza de dados.

É possível perceber, através do gráfico ilustrado na figura 40, que a quantidade de Triton-X100 aplicado no sistema apresenta uma relação quantitativamente inversa à intensidade de fluorescência das proteínas no sobrenadante. A todas as proteínas testadas, de modo geral, esse resultado implica que na menor concentração de Triton-X100 aplicada às nanopartículas funcionalizadas, maior é a quantidade de proteína fluorescente desligada da nanopartícula. À medida que a quantidade de detergente aumenta, menor é a quantidade de proteína detectada no sobrenadante de lavagem (fração desligada). Nesse mesmo sentido, a partir de 2% de Triton-X100 aplicado no sistema, as quatro proteínas apresentam o mesmo comportamento linear de dessorção, indicando que o sistema atingiu, a essa concentração, um estado de equilíbrio de dessorção. Por este motivo, os dados de 4 e 6% de Triton-X100 foram ocultados do gráfico.

Apesar da curva de saturação de dessorção ocorrer em todas as nanopartículas funcionalizadas com as diferentes proteínas, foi possível notar diferenças significativas na intensidade de fluorescência para cada proteína desligada em cada etapa de lavagem, essencialmente nas etapas iniciais. Por exemplo, a proteína sfGFP-sSBD obteve a maior F.I. (intensidade de fluorescência) desligada da nanopartícula após a lavagem com o tampão de

0,1% de Triton-X100 (756,6 de RFU), ao passo que as proteínas sfGFP-SBD e sfGFP-sSBDA tiveram menos F.I. presente no sobrenadante de lavagem (677 e 234,6 RFU, respectivamente), com a mesma porcentagem de detergente aplicada. A proteína controle, sfGFP sem cauda SBD, no mesmo sentido, obteve pouca F.I. na fração desligada (166 de RFU), semelhante ao visualizado para sfGFP-sSBDA. Essa tendência decaiu para todas as proteínas, na mesma proporção, à medida em que se aumenta a quantidade de detergente aplicado no sistema nas etapas posteriores de lavagem (0,5; 1 e 2% de Triton-X100).

Esses resultados estão intimamente relacionados à quantidade estimada de proteína inicialmente imobilizada na nanopartícula antes do início do teste. Nesse sentido, a intensidade de fluorescência no sobrenadante mensurada em cada etapa de lavagem é diretamente proporcional à quantidade estimada de proteína imobilizada inicialmente às nanopartículas antes do processo de dessorção. A figura 41 demonstra graficamente o perfil de retenção de fluorescência das diferentes proteínas após a imobilização e as etapas de lavagem durante o aumento gradual de Triton-X100.

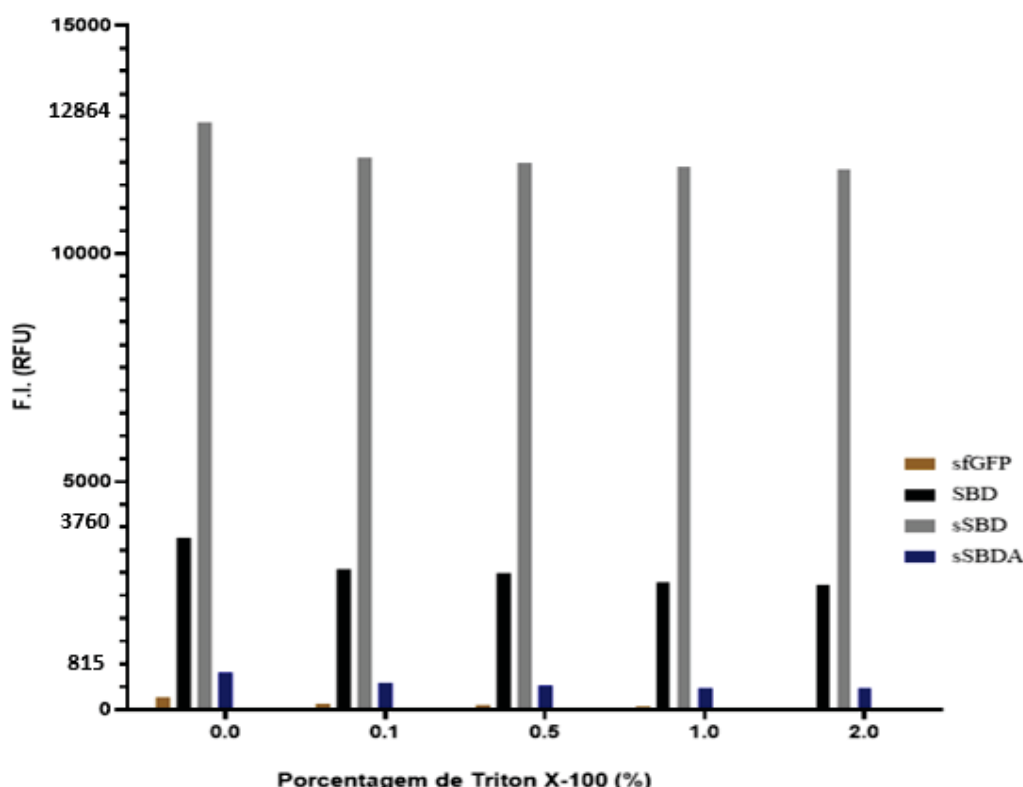


Figura 41. Perfil de retenção de fluorescência das diferentes proteínas recombinantes após as etapas de dessorção com Triton-X100. No eixo Y, a intensidade de fluorescência (*Fluorescence Intensity*), em RFU, das proteínas que permaneceram adsorvidas na nanopartícula após a imobilização e as etapas de lavagem com diferentes tampões contendo Triton-X100. No eixo X, a porcentagem do detergente Triton-X100 (%) usado em diferentes concentrações nos tampões de lavagem (0,1; 0,5; 1; 2; 4 e 6%), sendo os dois últimos pontos omitidos do gráfico por clareza de dados.

No início do experimento, como demonstra a figura 41, é possível perceber que após a remoção da fração não ligada, onde a concentração de Triton X-100 era 0%, a fluorescência indireta que corresponde à quantidade de proteína adsorvida indiretamente na nanopartícula era maior para a proteína sfGFP-sSBD (12.864 RFU) em detrimento de sfGFP-SBD (3.760 RFU) e sfGFP-sSBDA (815 RFU). Esse dado inicial, pré-ensaio dessortivo, confirma os dados obtidos nos experimentos de saturação e densitometria, indicando que a proteína sfGFP-sSBD apresenta maior afinidade de imobilização na nanopartícula e maior rendimento de imobilização do que as demais.

Após a primeira lavagem dessortiva, onde a concentração de Triton-X-100 é de 0,1%, a proteína sfGFP-sSBD apresentou também maior resistência de desligamento ao PHB do que as demais, dessorvendo apenas 756 de RFU (unidades relativas de fluorescência) e retendo ainda 12.107 de RFU na NP-PHB (Figura 40). Conseqüentemente, foi possível calcular o índice de retenção de fluorescência imobilizada para a proteína sfGFP-sSBD, a qual obteve um índice de 94,2% de retenção após essa primeira lavagem. Já as proteínas sfGFP-SBD e sfGFP-sSBDA, que apresentaram uma ligeira dessorção mais acentuada do que a variante sSBD na presença de 0,1% de detergente, dessorveram 677 RFU e 234 RFU, respectivamente, e mantiveram 3.083 e 581 de RFU de fluorescência retida. Sendo assim, sfGFP-SBD e sfGFP-sSBDA apresentaram um índice de retenção de fluorescência ligeiramente menor que a sfGFP-sSBD após lavagem, de 82 e 71%, respectivamente.

Os índices de retenção foram calculados através da equação:

$$R_f = \left(\frac{F_d \times 100}{F_{ii}} \right) - 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo R_f a retenção de fluorescência, dada em porcentagem; F_d a fluorescência dessorvida após a etapa de lavagem, dada em RFU e F_{ii} a fluorescência imobilizada inicial (no início do ensaio, com a nanopartícula saturada), também dada em RFU.

Ainda na figura 41, pode-se notar que ao aumentar a concentração de Triton-X nos tampões de lavagem para 0,5%, as proteínas apresentaram índices de retenção semelhantes (98, 93 e 90%, respectivamente a sfGFP-sSBD, sfGFP-SBD e sfGFP-sSBDA) e pouco significativos entre si, diminuindo gradualmente suas fluorescências no sobrenadante até o

platô de dessorção, onde é visualizado um padrão colinear de dessorção a partir de 2% de Triton-X-100 no meio, nos quais as intensidades de fluorescência no sobrenadante tornam-se constantes após cada lavagem.

No estudo de Mato-Blanco (2020), um estudo prévio de dessorção da fasina PhaF e variantes utilizando gradiente de Triton-X100 foi realizado na superfície de grânulos de PHB para determinar a estabilidade de ligação da proteína em relação às suas variantes. Foi verificado que a mutante Bi1-G apresenta uma retenção de 90%, permanecendo ligada ao grânulo mesmo após aplicar 1,5% de Triton-X100, em detrimento da PhaF selvagem (BioF-G), que apresentou apenas 75% de retenção. A principal característica da variante Bi1-G é que ela apresenta um tamanho menor e, segundo os autores, foi testada como possível *tag* de ancoragem para estudos futuros envolvendo partículas de PHB. Esse resultado é semelhante ao resultado obtido com a variante sfGFP-sSBD, a qual também apresenta redução de tamanho em relação à SBD WT (sfGFP-SBD) e uma retenção na faixa de 90%. Entretanto, o mesmo não pode ser afirmado em relação à variante sSBDA, que apresenta o mesmo tamanho, mas menor eficiência de retenção.

Nesse sentido, os dados obtidos a partir do início desse ensaio confirmam os parâmetros da isoterma de Freundlich, onde os valores de $1/n$ refletem a possível intensidade de adsorção em relação aos sítios irregulares do polímero de PHB. Em ambos os resultados, é possível perceber que a proteína sfGFP-sSBD apresenta maior intensidade e estabilidade de adsorção na nanopartícula, seguida de uma ligeira discrepância em relação à proteína sfGFP-SBD e por último, à proteína sfGFP-sSBDA, com menor valor de $1/n$ e menor retenção de fluorescência inicial imobilizada.

5.14 Previsão estrutural da conformação das proteínas recombinantes

A previsão estrutural *in silico* da conformação nativa das proteínas recombinantes sfGFP-SBD, sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA foram realizadas através do software RoseTTA Fold, o qual usa inteligência artificial de aprendizagem profunda para modelar proteínas no formato *ab initio*, ou seja, sem a presença de um modelo de homologia prévio. As figuras 42 e 43 mostram os modelos tridimensionais obtidos após a inserção da sequência de entrada (estrutura primária) das proteínas no portal de entrada *input* do próprio servidor.

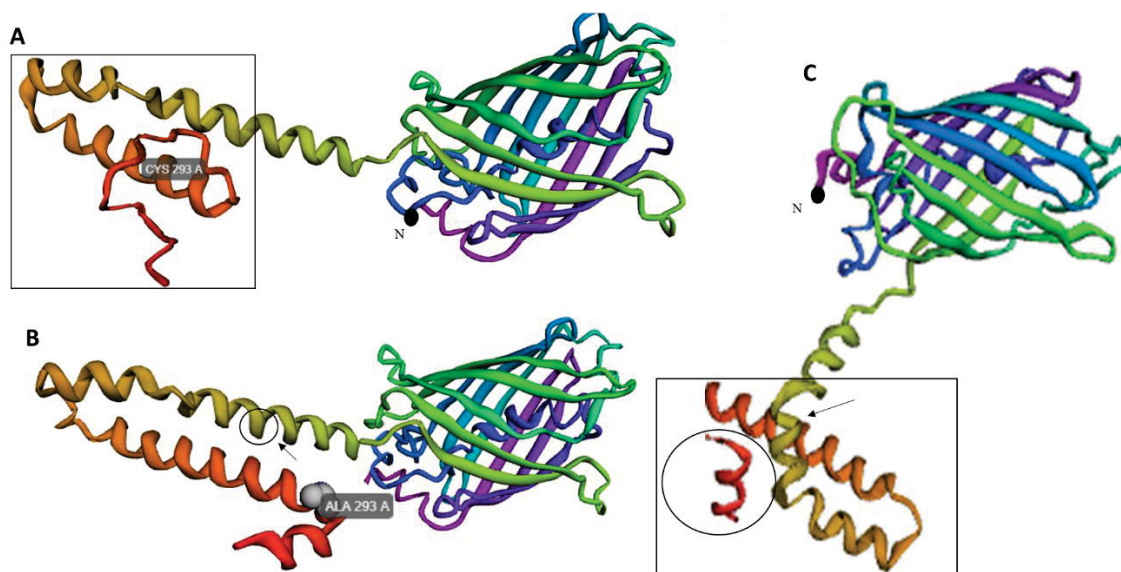


Figura 42. Previsão estrutural das proteínas recombinantes pelo software RoseTTA Fold. Os modelos são apresentados conforme o espectro de cor, sendo a região N-terminal (representada por N nas imagens) roxa, o barril- β do domínio sfGFP na região intermediária em verde e os resíduos que compõem a extremidade C-terminal são representados em amarelo, laranja e vermelho. Os quadrados evidenciam os domínios de ligação ao substrato (SBD) das proteínas sfGFP-sSBD (A), sfGFP-sSBDA (B) e sfGFP-SBD (C), respectivamente. As setas indicam o resíduo que inicia esses domínios e o círculo na figura C corresponde à cauda 6His. O resíduo mutado C487A em sfGFP-sSBDA é evidenciado na figura B em detrimento do resíduo original (C487) na figura A.

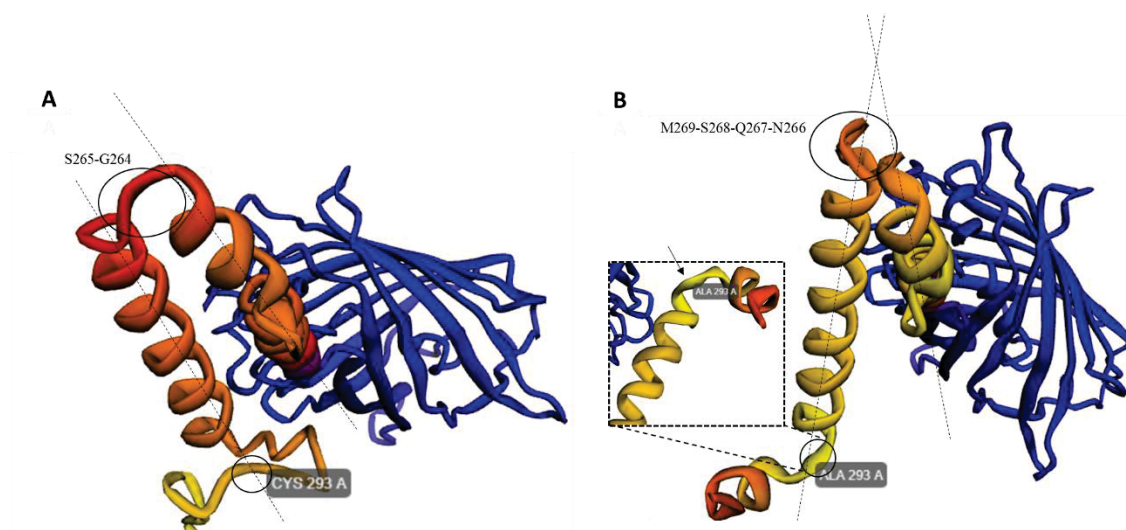


Figura 43. Domínios SBD C-terminais das variantes sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA modeladas por RoseTTA Fold. Previsão estrutural das proteínas sfGFP-sSBD (A) e sfGFP-sSBDA (B) ampliadas na região SBD C-terminal. A cor nesta imagem está de acordo com a estimativa de erro, sendo azul regiões bem resolvidas estruturalmente e amarelas com maior grau de incerteza e probabilidade de erro. A seta indica a presença do resíduo A293 na cauda sSBDA de sfGFP-sSBDA (B) e o círculo (A) demonstra o resíduo C293 na cauda sSBD de sfGFP-sSBD. As linhas tracejadas indicam eixos imaginários de intersecção.

Analisando os modelos de maior confiança selecionados pelo software, as proteínas sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA apresentam acurácia de 0,78 do total de 1,0, enquanto sfGFP-

SBD apresenta 0,72. Na figura 43, os modelos são coloridos conforme a estimativa de erro de seus resíduos, sendo a sequência de resíduos de aminoácidos que compõem a região C-terminal representada em amarelo, o que significa que apresenta maior estimativa de erro. Comparando as duas variantes SBD, percebe-se que o domínio sSBD possui menos estimativa de erro (em laranja) do que o domínio sSBDA (em amarelo).

De modo geral, percebe-se que as proteínas apresentam similaridade estrutural, sendo constituídas por um domínio sfGFP N-terminal bem definido, com predominância de folhas- β , as quais correspondem ao barril- β da sfGFP, e os domínios SBD, sSBD e sSBDA mais afastados, na porção C-terminal. Os domínios SBD das três proteínas apresentam a mesma configuração: 2 α -hélices de comprimentos variados, separados por uma região de *looping* interconectando as duas estruturas secundárias, o qual também varia de comprimento em cada proteína.

Nota-se também na figura 43 que a estrutura geral das variantes sSBD e sSBDA apresentam poucas diferenças observáveis. Cabe ressaltar, entretanto, que o resíduo 293 apresenta duas funções diferentes. Em sfGFP-sSBD, o resíduo de Cys na posição 293 é mantido, o que faz com que não exista uma quebra de padrão estrutural a partir da posição desse resíduo, uma vez que os aminoácidos adjacentes mantêm a conformação desestruturada C-terminal. Essa situação possibilita caracterizar o domínio sSBD como sendo constituído por quatro regiões: I) uma α -hélice de 24 resíduos (A239-N263) mais N-terminal; II) uma região de *looping* (G264-S265); III) uma segunda α -hélice de 20 resíduos (N266-A285) mais C-terminal e IV) uma região desordenada C-terminal de 17 resíduos (G286-H302), a qual inclui o resíduo C293.

Entretanto, as proteínas sfGFP-sSBDA e sfGFP-SBD apresentam uma configuração semelhante à letra “Z”, sendo constituídas por 3 α -hélices, conectadas por 2 regiões *loopings*. O primeiro *looping*, mais N-terminal, como demonstra a figura 43, é composto por 4 resíduos de aminoácidos (N266-Q267-S268-M269), o qual conecta a α -hélice mais N-terminal (A245-S265) de 20 resíduos com a α -hélice intermediária, de 22 resíduos (G270-N292). Entretanto, diferente de sfGFP-sSBD, é possível notar que a substituição da Cys por Ala na posição 293 da cauda SBD promove uma dobra na estrutura, funcionando como o segundo *looping* que conecta as duas α -hélices C-terminais: a α -hélice C-terminal composta majoritariamente pelos resíduos da 6His-tag (P294-H302), de 9 resíduos, e a α -hélice intermediária, que compreende os 22

resíduos. Devido às semelhanças estruturais dos domínios SBD e sSBDA, é sugerido que a estrutura em forma de Z, contendo 3 α -hélices, seja mais instável e menos favorável à imobilização ao PHB, uma vez que essa estrutura não ocorre em sfGFP-sSBD.

Além disso, é possível perceber também que o *looping* que conecta as duas α -hélices nas estruturas SBD de sfGFP-sSBD e sfGFP-sSBDA provocam uma diferença de ângulo no afastamento de ambas as cadeias. Em sfGFP-sSBD as duas α -hélices estão mais próximas e paralelamente alinhadas em relação a eixos paralelos imaginários, resultado do menor ângulo de torção a que essas estruturas foram submetidas pelo *looping* G264-S265. Já na proteína sfGFP-sSBDA, o ângulo que separa as α -hélices é maior, o que promove uma divergência espacial entre as cadeias a partir da região de *looping* composta de 4 resíduos de aminoácidos (N266-Q267-S268-M269). Uma organização análoga da estrutura geral de sSBDA é visualizada para a proteína sfGFP-SBD prevista pelo software RoseTTA Fold, permitindo associar, funcionalmente, a menor afinidade e interação de ambas ao PHB em relação à proteína sfGFP-sSBD.

Essa configuração estrutural descrita é muito semelhante à estrutura das fasinas, principalmente de PhaP de *Aeromonas hydrophyla*, cristalizada por Zhao et al. (2016). Neste estudo, a resolução da estrutura de PhaP foi definida como um tetrâmero em solução. Cada monômero apresenta 2 a 3 α -hélices separadas por regiões de *loopings*. Entretanto, essas cadeias são consideradas anfipáticas, onde os resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos das suas faces externas são essenciais para manter as relações inter-cadeia/inter-monômeros e com o PHB, respectivamente. No estudo de Neumann et al. (2008), os resultados de SAXS indicam que a PhaP de *R. eutropha* se apresenta como trímero em solução, na forma planar, o qual fornece maior estabilidade para interagir com a superfície hidrofóbica do PHB.

Nesse sentido, essas duas α -hélices do domínio SBD e variantes parecem estabelecer uma estrutura de suporte basal para que o domínio sfGFP fique exposto no solvente, enquanto os resíduos hidrofóbicos da face externa das suas hélices estabeleçam a interação direta com o polímero. Sugere-se também que resíduos hidrofílicos e carregados nas suas faces externas opostas à face hidrofóbica estabeleçam interações inter-cadeia para mantê-las próximas. Essa hipótese pode também ser sustentada pelas análises de agregação das proteínas a partir de 30 μ g em solução, onde as interações hidrofóbicas entre as α -hélices dos domínios SBD-SBD de proteínas vizinhas parecem ser predominantes e permitirem a formação de oligômeros.

Em sfGFP-sSBD, a distância entre as α -hélices é menor, o que favorece a estabilidade de interação intercadeia. Já em sfGFP-sSBDA e sfGFP-SBD, as cadeias α -hélices estão mais distanciadas devido a um maior ângulo de separação entre elas, adotando uma configuração em Z. Acredita-se que essa distância entre as cadeias possa reduzir as interações entre elas e, conseqüentemente, afetar indiretamente na força de interação com a superfície do polímero. Essa hipótese pode justificar os valores de n/l inferiores aos de sfGFP-sSBD nas isotermas, à menor quantidade de proteína imobilizada na nanopartícula pelos resultados de densitometria e à maior dessorção dessas proteínas frente a variante sSBD. Dessa forma, essa configuração em Z está relacionada a estabilidade da proteína. Análises térmicas de DLS com aumento gradual de temperatura para identificar o ponto de *melting* entre as proteínas são possíveis testes a serem desenvolvidos para elucidar essa questão.

Os estudos cristalográficos e de previsão estrutural de PhaZ de *Paucimonas lemoignei* e *Penicillium funiculosum* proposto por Jendrossek et al. (2013) e Hisano et al. (2005), respectivamente, descrevem o aparecimento de uma estrutura predominantemente formada por 2 a 3 folhas- β separadas por 3 *loopings* no domínio C-terminal, o qual eles identificam como o domínio de ligação ao substrato (SBD). Entretanto, não há descrição detalhada de como ocorre a interação dessas estruturas secundárias ao PHB. Essa variação observada de estruturas compondo o domínio SBD pode ser explicada tanto pela diferença de tamanho quanto pela identidade da própria estrutura primária das proteínas *in natura* (PhaZ) e das proteínas recombinantes adotadas nesse estudo.

Vale ressaltar que essas conformações *in silico* são modeladas a partir do pressuposto que elas estejam livres em solução, em seu estado monomérico. Análises mais detalhadas das interações proteínas-proteínas e proteína-PHB utilizando softwares apropriados a esse tipo de previsão, como *docking* molecular, poderiam indicar modelagens mais precisas da organização dessas proteínas na interface das nanopartículas e da conformação estrutural dessas proteínas em solução, incluindo possibilidades de dimerização e oligomerização, como supostamente ocorre com as proteínas sfGFP-SBD, analisadas pelos resultados obtidos por SAXS e DLS, como indicam os itens 5.11 e 5.10, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

A funcionalização de nanopartículas com proteínas e/ou fármacos é um método complexo e customizável para otimizar a utilização de NPs no mercado biotecnológico. Esse

processo depende da análise das características químicas e físicas da nanopartícula e da biomolécula a ser imobilizada, bem como o tipo de interação entre esses dois componentes. Por meio das análises de microscopia eletrônica e análise de dispersão de luz dinâmica (DLS), foi possível verificar que as nanopartículas de PHB apresentam predominantemente morfologia esférica, com tamanho variando em torno de ~200 nm e com uma topografia heterogênea. Essas características incluem superfícies irregulares que proporcionam sítios de adsorção específicos.

As proteínas deste estudo, por outro lado, foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) e nas caudas C-terminais apresentam peptídeos com afinidade ao PHB, conhecidos como etiqueta SBD e suas variantes (sSBD e sSBDA). Esses peptídeos variam em tamanho e conteúdo de aminoácidos. Observou-se que, por meio das microscopias eletrônicas, confocal e de força atômica, as variantes dessas caudas SBD estudadas aqui mostraram-se funcionais, em contraste com o controle negativo (sfGFP sem cauda SBD).

Para uma quantificação mais precisa da eficiência de imobilização, realizou-se ensaios de saturação de nanopartículas utilizando ensaios de fluorescência e SDS-PAGE acoplada à densitometria. Esses ensaios demonstraram que a etiqueta sSBD apresenta uma afinidade de imobilização superior às demais. A intensidade das bandas de proteína nas frações imobilizadas de sfGFP-sSBD foi maior do que nas outras proteínas, fornecendo uma estimativa qualitativa desse resultado. Esse resultado foi confirmado por densitometria de banda e por uma modelagem matemática do seu processo de adsorção baseado na intensidade de fluorescência.

Dessa forma, os resultados indicam que a variante sfGFP-sSBD demonstra uma eficiência de imobilização aproximadamente duas vezes superior à variante não modificada (selvagem) sfGFP-SBD e quase quatro vezes maior que a da variante sfGFP-sSBDA, de acordo com o rendimento de imobilização.

Quanto à estabilidade de imobilização nas nanopartículas, a proteína sfGFP-sSBD também se mostrou superior durante os testes de dessorção. Quando diferentes concentrações de detergente foram usadas nos tampões de lavagem, a etiqueta sSBD reteve até 94% da proteína na nanopartícula quando 0,1% de Triton-X foi adicionado, em comparação com 82% e 71% para as proteínas sfGFP-SBD e sfGFP-sSBDA, respectivamente.

Portanto, este estudo alcançou, em parte, a hipótese de otimização da imobilização de proteínas recombinantes em nanopartículas de PHB usando variantes da etiqueta SBD para

ancoragem. Parece que o tamanho da etiqueta não é o fator mais importante na imobilização, quando comparado com o conteúdo de cisteína. Acredita-se que a presença de uma cisteína na etiqueta favoreça a imobilização, mas a presença de 2 ou nenhuma não parece afetar diretamente a estabilidade e, conseqüentemente, a imobilização. Esses resultados sugerem ainda que substituição de resíduos de aminoácidos pode ainda aumentar a afinidade da etiqueta SBD por PHB.

As análises de modelagem computacional indicam que todas as proteínas deste estudo apresentam uma mesma estrutura geral, caracterizada por um domínio N-terminal composto pelas folhas- β da sfGFP e por um domínio C-terminal, o qual apresenta afinidade com o PHB. Este domínio em particular é composto por 2 a 3 α -hélices paralelas, as quais provavelmente estão envolvidas na ancoragem das proteínas nas nanopartículas. No entanto, a modelagem sozinha não é suficiente para determinar como a ausência dos resíduos de cisteína afeta a afinidade da cauda ao PHB na proteína sfGFP-sSBDA, nem como as mutações influenciam a afinidade e o rendimento de imobilização. Ensaio mais precisos serão necessários para esclarecer as alterações conformacionais resultantes dessas mutações.

Em resumo, os resultados indicam que a proteína sfGFP-sSBD é uma variante otimizada para imobilizar proteínas de interesse em nanopartículas de PHB, apresentando inclusive, melhor estabilidade após a imobilização. Esse resultado favorece, assim, seu uso para futuras aplicações na área imunológica.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, R.; SARDAR, M. Enzyme Immobilization: An overview on nanoparticles as immobilization matrix. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**. v. 04, n. 02. 2015.
- ALBALAWI, F.; HUSSEIN, M. Z.; FAKURAZI, S.; MASARUDIN, M. J. Engineered Nanomaterials: The Challenges and Opportunities for Nanomedicines. **International Journal of Nanomedicine**. v. 16, n. 01, p. 161–184. 2021.
- AL-HAKKANI, M. F. Biogenic copper nanoparticles and their applications: A review. *SN Applied Sciences*. v. 2, n. 505. 2020. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2279-1>
- ALTHURI, A.; MATHEW, J. A.; SINDHU, R. A.; BANERJEE, R. B.; PANDEY, A. A.; BINOD, P. Microbial synthesis of poly-3-hydroxybutyrate and its application as targeted drug delivery Vehicle. **Bioresource Technology**. v. 145, p. 290–296. 2013.
- ALTINTAS, Z. **Biosensors and nanotechnology: applications in health care diagnostics**. Germany: Wiley. 382 p. 2018.

- ALVES, E.G.L., REZENDE, C.M., DE, F., SERAKIDES, R., PEREIRA, M., DE, M., ROSADO, I.R. Orthopedic implant of a polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyapatite composite in cats. **J. Feline Med. Surg.** v. 13, p. 546–552. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2011.03.002>
- ALVES, L. P. S.; DO AMARAL, F. P.; KIM, D. *et al.* Importance of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) metabolism to the ability of *Herbaspirillum seropedicae* to promote plant growth. **Applied & Environmental Microbiology**, [S. n.], [S.l.]. 2020.
- ALVES, L.; TEIXEIRA, C.; TIRAPELLE, E. *et al.* Backup expression of the PhaP2 phasin compensates for phaP1 deletion in *Herbaspirillum seropedicae*, maintaining fitness and PHB accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 739. 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00739.
- ANAL, A. K. **Bionanotechnology: principles and applications**. CRC Press: New York. 2018. 205 p.
- ANEJA, P.; ZACHERTOWSKA, A.; CHARLES, T. C. Comparison of the symbiotic and competition phenotypes of *Sinorhizobium meliloti* PHB synthesis and degradation pathway mutants. **Can. J. Microbiol.**, v. 51, p. 599-604, 2005.
- ANJUM, A. *et al.* Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 161–174, 2016.
- ANSARI, S.; SAMI, N.; YASIN, D.; AHMAD, N.; FATMA, T. Biomedical applications of environmental friendly poly-hydroxyalkanoates. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 183, p. 549–563. 2021.
- ANZAGHE, M.; S. SCHÜLKE, S.; SCHEURER, S. Partículas semelhantes a vírus como sistemas transportadores para melhorar a imunomodulação na imunoterapia com alérgenos atual. **Allergy Asthma Rep.** v. 18, p. 71-83. 2018. DOI: 10.1007 / s11882-018-0827-1
- ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. A. Protein engineering towards biotechnological production of bifunctional polyester beads. **Biotechnology Letters**, v. 31, [S. n.], p. 131–137. 2009.
- BABOS, G.; RYDZ, J.; KAWALEC, M. *et al.* Poly(3-Hydroxybutyrate)-Based Nanoparticles for Sorafenib and Doxorubicin Anticancer Drug Delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7312. 2020. DOI: doi:10.3390/ijms21197312
- BÄCKSTRÖM, B. T.; BROCKELBANK, J. A.; REHM, B. H. A. *Escherichia coli* recombinante produz grânulos de biopoliéster feitos sob medida para aplicações em classificação de células ativadas por fluorescência: exibição funcional da interleucina-2 de camundongo e glicoproteína oligodendrócitos de mielina. **BMC Biotechnol.** v. 7, p. 1-3. 2007.
- BAEK, M.; DIMAIO, F.; ANISHCHENKO, I. *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**. [S. n.]. 2021.
- BANKI, M. Z.; GERNGROSS, T. U.; WOOD, D. W. Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. **Protein Science**, v. 14, p. 1387–139. 2005. DOI: <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1110/ps.041296305>
- BARBALINARDO, M.; CAICCI, F.; CAVALLINI, M. *et al.* Protein Corona Mediated Uptake and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Mouse Embryonic Fibroblast. **Small**, v. 14, n. 34. 2018.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics**. V. 1767, n. 09, p. 1073-1101. 2007.
- BASUMATARY, I. B.; MUKHERJEE, A.; KATIYAR, V.; KUMAR, S. Biopolymer-based nanocomposite films and coatings: Recent advances in shelf-life improvement of fruits and vegetables. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 30, n. 162, p. 1–24. 2020.
- BELLO-GIL, D.; MAESTRO, B.; FONSECA, J.; DINJASKI, N.; PRIETO, M. A.; SANZ, J. M. Poly-3-Hydroxybutyrate Functionalization with BioF-Tagged Recombinant Proteins. **Applied Environmental Microbiology**. v. 08, n. 04. 2018.
- BENÍTEZ-MATEOS, A. I.; MEHRAVAR, E.; LOZANO, S. V.; TOMOVSKA, R.; SALASSA, L.; LÓPEZ-GALLEG, F. Selective Immobilization of Fluorescent Proteins for the Fabrication of Photoactive Materials. **Molecules**. v. 24, n. 2775. 2019. doi:10.3390/molecules24152775

BERNADO, P.; SVERGUN, D.I. Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. **Mol. BioSyst.**, 2011.

BLATCHFORD, P. A.; SCOTT, C.; FRENCH, N. *et al.* Immobilization of organophosphohydrolase OpdA from *Agrobacterium radiobacter* by overproduction at the surface of polyester inclusions inside engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 109, n. 05, p. 1101-1108. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.24402>

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, n. 2-3, p. 127-161, 1998.

BURGESS, R. R.; DEUTSCHER, M. P. **Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification**, 2 Ed. Elsevier Inc.: USA. 2009.

BYROM, D. Polyhydroxyalkanoates, In: Mobley DP (ed) Plastic from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors. **Hanser Munich**, pp. 5-33, 1994.

CAI, G. Q.; DRISCOLL, B. T.; CHARLES, T. C. Requirement for the enzymes acetoacetyl coenzyme A synthetase and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) synthase for growth of *Sinorhizobium meliloti* on PHB cycle intermediates. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 2113-2118, 2000.

CARNEIRO, L. A. B. C.; WARD, R. J. Functionalization of paramagnetic nanoparticles for protein immobilization and purification. **Analytical Biochemistry**. v. 540, n. 541, p. 45-51. 2018.

CHAN, L.; CROSS, H. F.; SHE, J. K.; CAVALLI, G.; MARTINS, H. F.; NEYLON, C. Covalent attachment of proteins to solid supports and surfaces via Sortase-mediated ligation. **PLoS ONE**. v. 2, n. 1164. 2007.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Pergamon BIODEGRADABLE POLYMERS. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 97, p. 1273-1335, 1998.

CHAUHAN, G.; MADOU, M. J.; KALRA, S. *et al.* **Nanotecnologia para COVID-19: terapêutica e pesquisa de vacinas**. ACS Nano, v. 14, p. 7760 - 7782. 2020.

CHEN, C.; CHENG, Y. C.; YU, C. H.; CHAN, S. W.; CHEUNG, M. K.; YU, P. H. F. *In vitro* cytotoxicity, hemolysis assay, and biodegradation behavior of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol)-poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles as potential drug carriers. **Journal of Biomedical Materials Research**. p. 290-298. 2008.

CHEN, M.; CUDA, G.; BUNIMOVICH, Y. *et al.* Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 01, p. 11-19. 2006.

CHEN, S.; CHIEN, Y.; CHAO, Y. *In vivo* immobilization of d-hydantoinase in *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience & Bioengineering**, v. 118, p. 78-81. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.020>

CHEN, S.; EVERT, B.; ADENIYI, A. *et al.* Ambient Temperature Stable, Scalable COVID-19 Polymer Particle Vaccines Induce Protective Immunity. **Advanced HealthCare Materials**, v. 11, n. 3, p. 1-14. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.202102089>

CHEN, S.; SANDFORD, S.; KIRMAN, J. R. *et al.* Innovative antigen carrier system for the development of tuberculosis vaccines. **The FASEB Journal**, v. 33, p. 7505-7518. 2019

CLOW, F.; FRASER, J. D.; PROFT, T. Immobilization of proteins to biocore sensor chips using *Staphylococcus aureus* sortase A. **Biotechnol. Lett.** v. 30, n. 160, p. 1603-1607. 2008.

COOLBAUGH, M. J.; SHAKALLI, M. J.; MADEIRA, D. W. High-throughput purification of recombinant proteins using self-cleaving intein tags. **Anal Biochem**. v. 516, p. 65-74. 2017. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.016.

CORREA, V. L. R.; MARTINS, J. A.; SOUZA, T. R. *et al.* Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 16

DESCHAMPS, J. R.; MILLER, C. E.; WARD, K. B. Rapid Purification of recombinant Green Fluorescent Protein using hydrophobic Properties of na HPLC Size-Exclusion Column. **Protein Expression and Purification**. V. 06, n. 4, p. 555-558. 1995.

- DHAKAL, S.; HIREMATH, J.; BONDRA, K.; LAKSHMANAPPA, Y. S.; SHYU, D. L.; OUYANG, K. et al. Biodegradable nanoparticle delivery of inactivated swine influenza virus vaccine provides heterologous cell-mediated immune response in pigs, **J. Control. Release.** V. 247, p. 194–205. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.039>.
- DINJASKI, N.; PRIETO, M. A. Swapping of Phasin Modules to Optimize the In Vivo Immobilization of proteins to Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Granules in *Pseudomonas putida*. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 3285-3293. 2013.
- DONG, J.; DING, X.; WANG, S. Purification of the recombinant green fluorescent protein from Tobacco plants using alcohol/salt aqueous two-phase system and hydrophobic interaction chromatography. **BMC Biotechnological.** V. 19, n. 89. 2019.
- ERRICO, C.; BARTOLI, C.; CHIELLINI, F.; CHIELLINI, E. Poly(hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Volume 2009.
- FANG, T.; VAN ELSEN, C. H. M. J.; DUARTE, J. N.; GUZMAN, J. S.; CHAHAL, J. S.; LING, J.; PLOEGH, H. L. Targeted antigen delivery by an anti-class II MHC VHH elicits focused aMUC1(Tn) immunity. **Chem. Sci.** v. 8, p. 5591. 2017. DOI: 10.1039/c7sc00446j
- FARNÓS, O.; VENEREO-SÁNCHEZ, A.; XU, X.; CHAN, C.; DASH, S.; CHAABANE, H.; SAUVAGEAU, J.; BRAHIMI, F.; SARAGOVI, U.; LECLERC, D.; A. KAMEN, A. A. Rapid High-Yield Production of Functional SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain by Viral and Non-Viral Transient Expression for Pre-Clinical Evaluation. **Vaccines.** v. 8, n. 654. 2020. DOI:10.3390/vaccines8040654.
- FASQUELLE, F.; DUBUQUOY, L.; BETBEDER, D. Starch-based NP act as antigen delivery systems without immunomodulating effect. **PLOS ONE**, v. 17, n. 07. 2022. DOI: e0272234
- FAUSER, J.; SAVITSKIY, S.; FOTTNER, M.; TRAUSCHKE, V.; GULEN, B. Sortase-Mediated Quantifiable Enzyme Immobilization on Magnetic Nanoparticles. **Bioconjugate Chemistry.** [S. n.]. 2020.
- FEBRIANTO, J., KOSASIH, A. N., SUNARSO, J., JU, Y.-H., INDRASWATI, N., ISMADJI, S. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent. **Journal of Hazardous Materials**, p. 616-645. 2009.
- FEIGIN, L.A.; SVERGUN, D.I. **Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering.** Plenum Press, New York, 1987.
- FERREIRA, L. F.; PICCO, A. S.; GALDINO, F. E.; ALBUQUERQUE, L. J. C.; BERRET, J. F.; CARDOSO, M. B. Nanoparticle-Protein Interaction: Demystifying the Correlation Between Protein Corona and Aggregation Phenomena. **Applied Materials and Interfaces.** 2022.
- FRANCIS, M. J. Recent Advances in Vaccine Technologies. **Vet Clin Small Anim**, v. 48, p. 231–241. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.002>
- FREUNDLICH, H. Über Die Adsorção em Lösungen. **Z. Física. Química.** V. 57, p. 385–470. 1907. doi: 10.1515/zpch-1907-5723.
- FUJITA, M.; KOBORI, Y.; AOKI, Y.; MATSUMOTO, N.; ABE, H.; DOI, Y.; HIRAISHI, T. (2005). Interaction between Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Depolymerase and Biodegradable Polyesters Evaluated by Atomic Force Microscopy. **Langmuir** 21, 11829-11835. DOI: 10.1021/la051903e
- GAN, Z. F.; JIANG, J. S.; YANG, Y. et al. Immobilization of homing peptide on magnetite nanoparticles and its specificity *in vitro*. **InterScience.** 2006.
- GARUFIA, G.; WANGA, Y. T.; OHA, S. Y.; MAIERA, H.; MISSIAKASA, D. M.; SCHNEEWINDA, O. Sortase-conjugation generates a capsule vaccine that protects guinea pigs against *Bacillus anthracis*. **Vaccine.** v. 30, p. 3435– 3444. 2012.
- GONZALEZ-MIRO, M. *et al.* Poliéster como transportador de antígeno para vacinas particuladas. **Biomacromoléculas**, v. 20, p. 3211-3212. 2019.
- GONZALEZ-MIRÓ, M.; RODRIGUÉZ-NODA, L.; FARIÑAS-MEDINA, M. *et al.* Self-assembled particulate PsaA as vaccine against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Heliyon**, v. 3, [S. n.]. 2017.

- GRAGE, K.; REHM, B. H. A. *In Vivo* Production of scFv-Displaying Biopolymer Beads Using a Self-Assembly-Promoting Fusion Partner. **Bioconjugate Chem.**, v. 19, n. 01, p. 254–262. 2008.
- GRASSMANN, M.; GRENACHER, B.; RODHE, B.; VOGEL, J. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. **Electrophoresis**. V. 30, p. 1845–1855. 2009.
- GRIEBEL, R.; SMITH, Z.; MERRICK, M. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry**, v. 7, p. 3676–3681, 1968.
- GRISHIN, A. M.; DOLGOVA, N. V.; LANDRET, S.; FISETTE, O.; PICKERING, I. J.; GEORGE, G. N.; FALZARANO, D. N.; CYGLER, M. Disulfide Bonds Play a Critical Role in the Structure and Function of the Receptor-binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Antigen. **Journal of Molecular biology**. v.434, n. 2. 2022.
- GUILLARD, V.; GAUCEL, S.; FORNACIARI, C.; ANGELLIER-COUSSY, H. The next generation of sustainable food packaging to preserve our environment in a circular economy context. **Front. Nutr.** v. 05, n. 121. 2018.
- GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small Angle Scattering of X-Rays**. New York, Wiley, 1955.
- HAGEMEYER, C. E.; ALT, K.; JOHNSTON, A. P. R.; SUCH, G. K.; TA, H. T.; LEUNG, M. K. M.; PRABHU, S.; WANG, X.; F. CARUSO, F.; PETER, K. **Nat. Protoc.** v. 10, p. 90–105. 2014.
- HANSSON, M.; NYGREN, P. A.; STAHL, S. Design and production of recombinant subunit vaccines. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 32, n. 95–107. 2000.
- HASANZADEH, A.; ALAMDARAN, M.; AHMADI, S. *et al.* Nanotechnology against COVID-19: Immunization, diagnostic and therapeutic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 336, p. 354-374. 2021. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.06.036
- HAUGHNEY, S. L.; PETERSEN, L. K.; SCHOOF, A. D.; RAMER-TAIT, A. E.; KING, J. D.; BRILES, D. E.; WANNEMUEHLER, M. J.; NARASIMHAN, B. Retention of structure, antigenicity, and biological function of pneumococcal surface protein A (PspA) released from polyanhydride nanoparticles. **Acta Biomater.** V. 9, p. 8262-8271. 2013.
- HAY, I. D.; JINPING, D.; REYES, P. R.; REHM, B. H. A. In vivo polyester immobilized sortase for tagless protein purification. **Microbial Cell Factories**. v. 14, n. 190. 2015. DOI 10.1186/s12934-015-0385-3
- HERMAWAN, S.; JENDROSSEK, D. Tyrosine 105 of *Paucimonas lemoignei* PHB depolymerase PhaZ7 is essential for polymer binding. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 1429-1435. 2009. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.002.
- HIRAISHI, T.; HIRAHARA, Y.; DOI, Y.; MAEDA, M.; TAGUCHI, S. Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB) depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n. 11, p. 7331-7338. 2006. DOI: 10.1128/AEM.01187-06.
- HIRAISHI, T.; KOMIYA, N.; MAEDA, M. Y443F mutation in the substrate-binding domain of extracellular PHB depolymerase enhances its PHB adsorption and disruption abilities. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 1370-1374. 2010^b. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.022.
- HIRAISHI, T.; KOMIYA, N.; MATSUMOTO, N.; ABE, H.; FUJITA, M.; MAEDA, M. Degradation and Adsorption Characteristics of PHB Depolymerase As Revealed by Kinetics of Mutant Enzymes with Amino Acid Substitution in Substrate-Binding Domain. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 113–119. 2010^a. DOI: 10.1021/bm900967a.
- HISANO, T.; KASUYA, K.; TEZUKA, Y.; *et al.* The Crystal Structure of Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Penicillium funiculosum* Provides Insights into the Recognition and Degradation of Biopolyesters. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, n. 04, p. 993-1004. 2006. DOI: 10.1016/J.JMB.2005.12.028.
- HONG, H., DONG, N., SHI, J., CHEN, S., GUO, C., HU, P., QI, H. Fabrication of a novel hybrid heart valve leaflet for tissue engineering: an in vitro study. **Artif. Organs**. v. 33, p. 554–558. 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00742.x>.
- HOSEINZADEH, E.; MAKHDOUNI, P.; TAHA, P. *et al.* Uma revisão sobre nano-antimicrobianos: nanopartículas metálicas, métodos e mecanismos. **Current Drug Metabolism**, v. 18, p. 120 – 128. 2017.

IHSSEN, J.; MAGNANI, D.; L. THÖNY-MEYER, L. *et al.* Uso de poli-hidroxiálcanoato despolimerase de cadeia média extracelular para ligação direcionada de proteínas a grânulos artificiais de poli[(3-hidroxióctanoato)-co-(3-hidroxihexanoato)]. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1854-1864. 2009.

JAIN, N.; JAIN, R.; THAKUR, N. *et al.* Nanotechnology: A safe and effective drug delivery system. **Asian J. Pharm. Clin. Res.**, v. 03, p. 159-165. 2010.

JENDROSSEK, D.; HERMAWAN, S.; SUBEDI, B.; PAPAGEORGIOU, A. Biochemical analysis and structure determination of *Paucimonas lemoignei* poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZ7 muteins reveal the PHB binding site and details of substrate-enzyme interactions. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 03, p. 649-664. 2013. DOI: 10.1111/mmi.12391.

JIN, Z.; GAO, S.; CUI, X. *et al.* Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 572, n. 118731. 2019.

JOSEPH, B. C.; PICHAIMUTHU, S.; SRIMEENAKSHI, S.; MURTHY, M.; SELVAKUMAR, K.; GANESAN, M.; MANJUNATH, S. R. An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Cell Science and Therapy**. v. 06, n. 05. 2015.

JOUDEH, N.; LINKE, D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. **Journal of Nanotechnology**. v. 20, n. 262. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>

KADDOR, C.; STEINBÜCHEL, A. Effects of homologous phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase system proteins on carbohydrate uptake and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 3582-3590, 2011.

KADOURI, D.; JURKEVITH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material poly-buhydroxybutyrate in *Azospirillum brasiliense* stress endurance and root colonization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 6, p. 3244-3250, 2003.

KASUYA, K.; OHURA, T.; MASUDA, K. *et al.* Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, p. 329-336. 1999.

KASUYA, K.; TAKANO, T.; TEZUKA, Y. *et al.* Cloning, expression and characterization of a poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Marinobacter* sp. NK-1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, n. 5, p. 221-226.2003.

KHAN, S.; MANSOOR, S.; RAFI, Z. *et al.* A review on nanotechnology: Properties, applications, and mechanistic insights of cellular uptake mechanisms. **Journal of Molecular Liquids**, v. 01, p. 1-15. 2021.

KHEIROLLAHPOUR, M.; MEHRABI, M.; DOUNIGHI, N. M.; MOHAMMADI, M.; MASOUDI, A. Nanoparticles and Vaccine Development. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 08, n. 01, p. 6 - 21. 2020. DOI: 10.2174/2211738507666191024162042.

KIKHNEY, A. G.; SVERGUN, D. I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. **FEBS Letters**. V 589, n. 19, p. 2570-2577. 2015.

KILIÇAY, E.; DEMIRBILEK, M.; TURK, M. *et al.* Preparation and Characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 44, n. 3, p. 310-320. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.08.013>

KUMARI, P.; KIRAN, B. R.; MOHAN, S. V. Polyhydroxybutyrate production by *Chlorella sorokiniana* SVMIICT8 under nutrient-deprived mixotrophy. **Bioresource Technology**. v. 354, n. 01. 2022.

LACERDA, L.; BIANCO, A.; PRATO, M. *et al.* Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 14, p. 1460-1470. 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. n. 277, p. 680-685. 1970.

LAKE, M. A. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. **Clinical Medicine**, v. 20, n. 02, p. 124-127. 2020. DOI: <https://doi.org/10.7861/clinmed.2019-coron>

- LAN, J. *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 215-220, 2020.
- LATOUR, R. A. The Langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior. **Society of Materials**. 2014.
- LEE, C.; JEONG, J.; LEE, T. *et al.* Nanoparticulas de polímero mimético de vírus exibindo hemaglutinina como uma vacina contra influenza sem adjuvante. **Biomaterials**, v. 183, p. 234-242. 2018.
- LEE, J.; JUNG, S.G.; PARK, C.S.; KIM, H.Y.; BATT, C.A.; KIM, Y.R. Tumor-specific hybrid polyhydroxybutyrate nanoparticle: Surface modification of nanoparticle by enzymatically synthesized functional block copolymer. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 21, p. 2941–2944. 2011.
- LEE, S.; PARK, J. P.; PARK, T. J.; LEE, S. Y.; LEE, S.; PARK, J. K. Selective Immobilization of Fusion Proteins on Poly(hydroxyalkanoate) Microbeads. **Anal. Chem.** V. 77, p. 5755-5759. 2006.
- LEE, Shin-Hae; LEE, Hye-Yeon; LEE, Eun-Ji *et al.* Effects of carbon nanofiber on physiology of *Drosophila*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3687-3697. 2015. DOI: 10.2147/IJN.S82637
- LEMOIGNE, M. Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide buxobutyrique. **Bull. Soc. Chem. Biol.** v. 8, p. 770-782, 1926.
- LEUNG, M. K. M.; HAGEMEYER, C. E.; JOHNSTON, A. P. R.; GONZALES, C.; KAMPHUIS, M. M. J.; ARDIPRADJA, K.; SUCH, G. K.; PETER, K.; CARUSO, F. Bio-click chemistry: Enzymatic functionalization of PEGylated capsules for targeting applications. **Angew. Chem.** v. 51, p. 7132–7136. 2012.
- Li, X.; Chang, H.; Huanan L. *et al.* Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds coated with PhaP-RGD fusion protein promotes the proliferation and chondrogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro*. **Society for Biomaterials**. [S. n.]. 2014.
- LIN, C.; ZHONG, Z.; MC, L. *et al.* Novas poli(amidoaminas) biorredutíveis para entrega de genes altamente eficiente. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 01, p. 138 – 145. 2007.
- LIU, Q.; ZOU, J.; CHEN, Z.; HE, W.; WU, W. Current research trends of nanomedicines. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. [S. n.]. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.05.018>
- LIU, Y.; HUANG, S.; ZHANG, Y.; XU, F. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. **J. Environ. Sci.** v. 26, n. 145. 2014.
- LOGOTHETIDIS, S. Nanotechnology: Principles and Applications. **NanoScience and Technology**. v. 59, n. 01. 2012. DOI:10.1007/978-3-642-22227-6_1
- LUENGO, J. M. *et al.* Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 251–260, 2003.
- MADDELA, N. R.; CHAKRABORTY, S.; PRASAD, R. Nanotechnology for Advances in Medical Microbiology. **Environmental and Microbial Biotechnology**. Springer Nature; Singapore. 432 p. 2021. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-9916-3>
- MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.
- MAEHARA, A.; DOI, Y.; NISHIYAMA, T.; TAKAGI, Y.; UEDA, S.; NAKANO, H.; YAMANE, T. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acid-producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans* phaP expression *in vitro*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 200, p. 9- 15, 2001.
- MAEHARA, A.; TAGUCHI, S.; NISHIYAMA, T.; YAMANE, T.; DOI, Y. A Repressor Protein, PhaR, Regulates Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis via Its Direct Interaction with PHA. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 14, p. 3992-4002, 2002.
- MAEHARA, A.; UEDA, S.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the pha locus of *Paracoccus denitrificans*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 2914- 2921, 1999.

- MAIA, J.L.; SANTANA, M.H.A.; RE, M.I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Braz. J. Chem. Eng.** V. 21, p. 1–12. 2004.
- MARTÍNEZ-DONATO, G.; PINIELLA, B.; AGUILAR, D. *et al.* Protective T cell and antibody immune responses against hepatitis C virus achieved using a biopolyester-bead-based vaccine delivery system. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 04, p. 370-378. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00687-15>.
- MASSA, S.; VIKANI, N.; BETTI, C.; BALLETT, S.; VANDERHAEGEN, S.; STEYAERT, J.; DESCAMPS, B.; VANHOVE, C.; BUNSCHOTEN, A.; VAN LEEUWEN, F. W. B.; FIJS W. B.; HERNOT, S.; CAVELIERS, V.; LAHOUTTE, T.; MUYLDERMANS, S.; XAVIER, C.; DEVOOGDT, N. Sortase A-mediated site-specific labeling of camelid single-domain antibody-fragments. **Contrast Media & Molecular Imaging**. v. 11, p. 328–339. 2016
- MATO, A.; BLANCO, F.; MAESTRO, B. *et al.* Dissecting the polyhydroxyalkanoate-binding domain of the PhaF phasin: Rational design of a minimized affinity tag. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 12, p. 1-17. 2020. DOI: [10.1128/AEM.00570-20](https://doi.org/10.1128/AEM.00570-20).
- MATOS, S. P. **Operações unitárias: fundamentos, transformações e aplicações dos fenômenos físicos e químicos**. São Paulo: Editora Érica Ltda, 2015.
- MILLER, L. M.; BOURASSA, M. W.; SMITH, R. J. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. **Biochim Biophys Acta**. V. 1828, n. 10, p. 2339-46. 2013. doi: [10.1016/j.bbamem.2013.01.014](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.01.014).
- MOHAMED, S.; MAY AMELIA, T. S. M.; AMIRUL, A. A. A.; EFFENDY, M.; WAHID, A.; BHUBALAN, K. Preliminary study on serum immunoglobulin G responses following intramuscular inoculation of adjuvanted polyhydroxyalkanoate microparticles with *Pasteurella multocida* vaccine in white rats. **Biologicals**. V. 71, p. 51–54. 2021.
- MOHAMMAPDOUR, R.; GHANDEHARI, H. Mechanisms of immune response to inorganic nanoparticles and their degradation products. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 180. 2022. DOI: [114022](https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114022).
- MOHANRAJ, V. J. CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v. 05, n. 01, p. 561-573. 2006.
- MOLLERUP, J. M. A Review of the Thermodynamics of Protein Association to Ligands, Protein Adsorption, and Adsorption Isotherms. **Chem. Eng. Technol.** v. 31, n. 6, p. 864–874. 2008.
- MONTAZER, M.; HARIFI, T. New approaches and future aspects of antibacterial food packaging: From nanoparticles coating to nanofibers and nanocomposites, with foresight to address the regulatory uncertainty. In **Nanotechnology in the Agri-Food industry**; GRUMEZESCU, A. M. Ed. Elsevier: Amsterdam. p. 533–565. V. 161. 2017.
- MOREIRA, J. B.; KUNTZLER, S. C.; VAZ, B. da S. *et al.* 13-Polyhydroxybutyrate (PHB)-based blends and composites. **Biodegradable Polymers, Blends and Composites**, v. 01, p. 389-413. 2022.
- MULLANEY, J. A.; REHM, B. H. A. Design of a single-chain multi-enzyme fusion protein establishing the polyhydroxybutyrate biosynthesis pathway. **Journal of Biotechnology**, v. 147, n. 03, p. 31-36. 2010.
- MULLER-SANTOS, M.; KOSKIMAKI, J. J.; ALVES, L. P. S. *et al.* The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 03. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa058>
- MURALIDHARAN, A.; RUSSELL, M. S.; LAROCQUE, L.; GRAVEL, C.; SAUV'É, S.; CHEN, Z. *et al.* Chitosan alters inactivated respiratory syncytial virus vaccine elicited immune responses without affecting lung histopathology in mice. **Vaccine**. V. 37, p. 4031–4039. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.003>.
- MURUEVA, A.V., SHISHATSKAYA, E.I., KUZMINA, A.M., VOLOVA, T.G., SINSKEY, A.J. Microparticles prepared from biodegradable polyhydroxyalkanoates as matrix for encapsulation of cytostatic drug. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** v. 24, p. 1905–1915. 2013. [http:// dx.doi.org/10.1007/s10856-013-4941-2](http://dx.doi.org/10.1007/s10856-013-4941-2)
- NAJAH-MISSAOUI, A.; D ARNOLD R.; CUMMINGS, B. S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? **International Journal of Molecular Sciences**. V. 31; n. 22; p. 385. 2020 doi: [10.3390/ijms22010385](https://doi.org/10.3390/ijms22010385).
- NASCIMENTO, R. F.; DE LIMA, A. C.; VIDAL, C. B.; MELO, D. D.; RAULINO, G. S. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. Fortaleza: Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará (UFC). 2014.

- NAVARRE, W. W.; SCHNEEWETND, O. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive Bacteria. **Molecular Microbiology**. v. 14, n. 01, p. 115-121. 1994.
- NEUMANN, L.; SPINOZZI, F.; SINIBALDI, R. *et al.* Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2911-2919. 2008. DOI: 10.1128/JB.01486-07.
- OLIVERA-UGARTE, S. M.; BOLDUC, M.; LALIBERTÉ-GAGNÉ, M. E.; BLANCHETTE, L. J.; GARNEAU, C.; FILLION, M.; SAVARD, P.; DUBUC, I.; FLAMAND, L.; FARNÓS, O.; XU, X.; KAMEN, A.; GILBERT, M.; RABEZANAHARY, H.; SCARRONE, M.; COUTURE, C.; BAZ, M.; LECLERC, D. A nanoparticle-based COVID-19 vaccine candidate elicits broad neutralizing antibodies and protects against SARS-CoV-2 infection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. v. 44. 2022. DOI: 102584
- ORYAN, A.; ALIDADI, S.; MOSHIRI, A.; MAFFULLI, N. Bone regenerative medicine: Classic options, novel strategies, and future directions. **J. Orthop. Surg. Res.** v. 09, n. 18. 2014.
- PANTAROTTO, D.; PARTIDOS, C. D.; HOEBEKE, J. *et al.* Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. **Chem. Biol.**, v. 10, p. 961–966. 2003.
- PAPAGEORGIOU, A.; HERMAWAN, S.; SINGH, C.; JENDROSSEK, D. Structural Basis of Poly(3-Hydroxybutyrate) Hydrolysis by PhaZ7 Depolymerase from *Paucimonas lemoignei*. **Journal of Molecular Biology**, v. 382, n. 05, p. 1184-1194. 2008. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.07.078.
- PARK, J. P.; LEE, K. B.; LEE, S. J. *et al.* Micropatterning Proteins on Polyhydroxyalkanoate Substrates by Using the Substrate Binding Domain as a Fusion Partner. **Wiley Periodicals, Inc.** p. 160-165. 2005. DOI: 10.1002/bit.20581.
- PARK, T. J.; PARK, J. P.; LEE, S. J. *et al.* Polyhydroxyalkanoate Chip for the Specific Immobilization of Recombinant Proteins and Its Applications in Immunodiagnosics. **Biotechnol. Bioprocess. Eng.**, v. 11, n. 2, p. 173-177. 2006.
- PARK, T. J.; YOO, S. M.; KEUM, K. C. *et al.* Microarray of DNA–protein complexes on poly-3-hydroxybutyrate surface for pathogen detection. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, p. 1639–1647. 2009. DOI: 10.1007/s00216-008-2574-y.
- PARLANE, N. A.; GRAGE, K.; MIFUNE, J. *et al.* Vaccines displaying mycobacterial proteins on biopolyester beads stimulate cellular immunity and induce protection against tuberculosis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 19, n. 01, p. 37-44. 2012. DOI: 10.1128 / CVI.05505-11
- PARLANE, N. A.; REHM, B. H. A.; WEDLOCK, D. N. *et al.* Novel particulate vaccines utilizing polyester nanoparticles (bio-beads) for protection against *Mycobacterium bovis* infection - A review. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 158, p. 8-13. 2014. DOI: 10.1016 / j.vetimm.2013.04.002
- PARRY, D.A.D.; BAKER, E.N. **Biopolymers**. Rep. Prog. Phys., v. 47, p. 1133-1232, 1984.
- PARTHASARATHY, R.; SUBRAMANIAN, S.; BODER, E. T. Sortase A as a novel molecular “stapler” for sequence-specific protein conjugation. **Bioconjug. Chem.** v. 18, p. 469–476. 2007.
- PATEL, A.; PATEL, M.; YANG, X. *et al.* Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles. **Protein & Peptide Letters**, v. 21, n. 11, p. 1102-1120. 2014.
- PAUW, B. R. Everything SAXS: small-angle scattering pattern collection and correction. **Journal of Physics: Condensed Matter**. V. 25. 2013.
- PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; Chitosan in Nanostructured Thin Films. **Biomacromolecules**. V. 11, p. 1897–1908. 2010.
- PE'DELACQ, J. D.; CABANTOUS, S.; TRAN, T.; TERWILLIGER, T. C.; WALDO, G. S. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**. v. 24, n. 01. 2006. DOI: 10.1038/nbt1172
- PENG, J.; LIANG, X.; CALDERON, L. Progress in research on gold nanoparticles in cancer management. **Medicine (United States)**, v. 98, n. 18. 2019.

- PERVEEN, K.; MASOOD, F.; HAMEED, A. Preparation, characterization and evaluation of antibacterial properties of epirubicin loaded PHB and PHBV nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 259-266. 2020
- PETERS, V.; REHM, B. H. A. In Vivo Enzyme Immobilization by Use of Engineered Polyhydroxyalkanoate Synthase. **Applied & Environmental Microbiology**, v. 72, n. 03, p. 1777–1783. 2006.
- PIEHLER, S.; WUCHERPFENNIG, L.; TANSI, F. *et al.* Hyperthermia affects collagen fiber architecture and induces apoptosis in pancreatic and fibroblast tumor hetero-spheroids in vitro: Hyperthermia affects collagen ECM and pancreatic tumor cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 28, [S. n.]. 2020
- PIEKARSKI, J.; IGNATOWICZ, K.; DABROWSKI, T. Analysis of Selected Methods Use for Calculation of the Coefficients of Adsorption Isotherms and Simplified Equations of Adsorption Dynamics with the Use of IZO Application. **Materials** (Basel). V. 14, n. 15, p. 4192. 2021. doi: 10.3390/ma14154192.
- POTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 552-560, 2005.
- POTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 552-560, 2005.
- PRIETO, M.A.; BUHLER, B.; JUNG, K.; WITHOLT, B.; KESSLER, B. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPO1 involved in the regulatory expression system for pha genes. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 858-868, 1999.
- PUTNAM, C.D.; GREG, M.H.; HURA, L.; TAINER, J.A. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 40, p. 191-285, 2007.
- QUINTANAR-GUERRERO, ALIEMANN, E. D.; HATEM, F. S.; DOELKER, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 24, n. 12, p. 11-13. 1998.
- RAI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M.; INGLE, A. P. **Nanobiotechnology in Diagnosis, Drug Delivery, and Treatment**. John Wiley & Sons Ltd: USA. 406 p. 2020.
- RASIAH, I. A.; REHM, B. H. A. One-Step Production of Immobilized-Amylase in Recombinant *Escherichia coli*. **Applied & Environmental Microbiology**, v. 75, n. 07, p. 2012-2016. 2009.
- RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3^a ed. Academic Press, Elsevier. 2012. 4094 p.
- RAZA, Z. A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 45-56. 2018.
- REGISTRY OF STANDARD BIOLOGICAL PARTS. iGEM, 2004. Disponível em: <https://parts.igem.org/Part:pSB1A2>. Acesso em 10 de outubro de 2023.
- REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Applied and Industrial Microbiology**. v. 08. 2010.
- REHM, B.H.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 25, p. 3–19. 1999.
- REIS, E.C.C., BORGES, A.P.B., FONSECA, C.C., MARTINEZ, M.M.M., ELEOTERIO, R.B., MORATO, G.O., OLIVEIRA, P.M. Biocompatibility, osteointegration, osteoconduction, and biodegradation of a hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 53, p. 817–826. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000400010>.
- RIGGS, P. **Fusion Proteins**. Encyclopedia of Genetics, v. 01, p. 739-740. New England Biolabs: EUA. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0487>
- RITZ, S.; SCHÖTTLER, S.; KOTMAN, N. *et al.* Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. **Biomacromolecules**. V. 16, n. 4, p. 1311-21. 2015. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00108.

- ROGERS, B.; ADAMS, J.; PENNATHUR, S. **Nanotechnology: The Whole Story**. Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis Group. 2013.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**. v. 05, n. 172. 2014.
- RUTH, K.; DE ROO, G.; EGLI, T.; REN, Q. Identification of two acyl-CoA synthetases from *Pseudomonas putida* GPo1: one is located at the surface of polyhydroxyalkanoates granules. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1652-1659, 2008.
- SACOMBOIO, E. N. M. et al. The transcriptional regulator NtrC controls glucose-6-phosphate dehydrogenase expression and polyhydroxybutyrate synthesis through NADPH availability in *Herbaspirillum seropedicae*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- SAEGUSA, H.; SHIRAKI, M.; KANAI, C.; SAITO, T. Cloning of an intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 94-100, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York City, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- SAMROT, A. V.; SAMANVITHA, S. K.; SHOBANA, N.; RENITTA, E.R.; SENTHILKUMAR, P.; KUMAR, S.S.; ABIRAMI, S.; DHIVA, S.; BAVANILATHA, M.; PRAKASH, P.; et al. The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. **Polymers**. v. 13, n. 3302. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13193302>
- SANDERS, W. C. **Basic Principles of Nanotechnology**. 1 ed. London: CRC Press. 195 p. 2019.
- SANDOVAL, A.; ARIAS-BARRAU, E.; BERMEJO, F.; CANEDO, L.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E. R.; LUENGO, J. M. Production of 3-hydroxy-n-phenylalkanoic acids by a genetically engineered strain of *Pseudomonas putida*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 97-105, 2005.
- SANTOS, N.; CASTANHO, M. An Overview of the Biophysical Applications of Atomic Force Microscopy. **Biophysical Chemistry**, v. 107, p. 133-149, 2004.
- SAREI, F.; DOUNIGHI, N.; ZOLFAGHARIAN, H.; KHAKI, P.; BIDHENDI, S. Alginate nanoparticles as a promising adjuvant and vaccine delivery system. **Indian J. Pharm. Sci.** v. 75, p. 442-449. 2013. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.119829>
- SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 2 Ed. Springer Advanced Texts in Chemistry: New York, 249 p. 1982.
- SEVASTIANOV, V.I., PEROVA, N.V., SHISHATSKAYA, E.I., KALACHEVA, G.S., VOLOVA, T.G., 2003. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. **J. Biomater. Sci. Polym.** v. 14, p. 1029-1042. 2003.
- SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246-265, 2008.
- SHAKERI, F.; SHAKERI, S.; HOJJATOLESLAMI, M. Preparation and Characterization of Carvacrol Loaded Polyhydroxybutyrate Nanoparticles by Nanoprecipitation and Dialysis Methods. **Journal of Food Science**. n. 01. 2014.
- SHAMSUDDIN, I. M.; JAFAR, J. A.; SHAWAI, A. S. A.; YUSUF, S.; LATEEFAH, M.; AMINU, I. Bioplastics as better alternative to petroplastics and their role in national sustainability: A review. **Adv. Biosci. Bioeng.** v. 05, p. 63-70. 2017.
- SHARMA, M.; TYAGI, J. L.; POLURI, K. M. Quantifying bacterial cell lysis using GFP based fluorimetric assay. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 138, p. 881-889. 2019.
- SHEN, R.; NING, Z.; LAN, Y.; CHEN, J.; CHEN, G. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis*. **Metabolic Engineering**, v. 54, p. 117-126. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.03.011>

- SHEN, R.; NING, Z.; LAN, Y.; CHEN, J.; CHEN, G. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis*. **Metabolic Engineering**, v. 54, p. 117-126. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.03.011>
- SHIRAKI, M.; OKURA, H.; SAITO, T. Transcriptional repression of the poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Ralstonia pickettii* T1 by a tetR-like gene. **Antonie van Leeuwenhoek**. V. 105, p. 89–98. 2014.
- SILVA, J.; FERNANDES, A. R.; BAPTISTA, P. V. **Application of nanotechnology in drug delivery**. In *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. London: InTech: A. D. Sezer, p. 127–154. 2014.
- SINGH, A. K. **Nanoparticle Ecotoxicology**. In *Engineered Nanoparticles: Structure, Properties and Mechanisms of Toxicity*. SINGH, A. K. Copyright, Elsevier Inc.: USA. 2016.
- SINGH, S.; UPADHYAY, M.; SHARMA, J. et al. A portable immunomagnetic cell capture system to accelerate culture diagnosis of bacterial infections. **Analyst**, v. 141, n. 11, p. 3358-3366. 2016
- SMITH, J. D.; MORTON, L. D.; ULERY, B. D. Nanoparticles as synthetic vaccines. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 34, p. 217-224. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.014>.
- SOETAERT, F.; KORANGATH, P.; SERANTES, D. *et al.* Cancer therapy with iron oxide nanoparticles: Agents of thermal and immune therapies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 163, n. 164, p. 65-83. 2020.
- SOFI, M. A.; SUNITHA, S.; SOFI, M. A. *et al.* An Overview of Antimicrobial and Anticancer Potencial of Silver Nanoparticles. **Journal of King Saud University – Science**, v. 34, n. 02. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101791>
- SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. Em **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. REZENDE, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L.R. vol. 04. Blucher. 1069 páginas. 2017.
- STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom D (ed) **Biomaterials: novel materials from biological sources**. Stockton, New York, pp. 124-213, 1991.
- STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 10, p. 419–427, 1998.
- STUBBE, J.; TIAN, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA. **Synthase Nat. Prod. Rep.**, v. 20, p. 445–457, 2003.
- STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A.J.; LAWRENCE, A.G.; LIU, P. NONTEMPLATE-DEPENDENT POLYMERIZATION PROCESSES: Polyhydroxyalkanoate Synthases as a Paradigm. **Annu. Rev. Biochem.** v. 74, p. 433- 480, 2005.
- SZLEIFER, I.; YERUSHALMI-ROZEN, R. Polymers and carbon nanotubes - Dimensionality, interactions and nanotechnology. **Polymer**, v. 46, n. 19, p. 7803-7818. 2005.
- TAN, D.; XUE, Y. S. S.; AIBAIDULA, G.; CHEN; G. Q. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. **Bioresour. Technol.** v. 102, p. 8130–8136. 2011.
- TANG, S.; XUAN, B.; YE, X.; HUANG, Z.; QIAN, Z. A Modular Vaccine Development Platform Based on Sortase-Mediated Site-Specific Tagging of Antigens onto Virus-Like Particles. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25741. 2016. DOI: 10.1038/srep25741
- TARTOFF, K. D.; HOBBS, C. A. **Meios melhorados para cultivo de clones de plasmídeo e cosmídeo**. Bethesda Res Lab Foco v. 9, n. 12. 1987.
- TEBALDI, M. L.; MAIA, A. L. C. POLETTO, F. *et al.* Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 115-126. 2019.
- THÉRIEN, A.; BÉDARD, M.; CARIGNAN, D.; RIOUX, G.; GAUTHIER-LANDRY, L.; LALIBERTÉ-GAGNÉ, M. E.; BOLDOC, M.; SAVARD, P.; LECLERC, D. A versatile papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling. **Journal of Nanobiotechnol.** v. 15, n. 54. 2017. DOI 10.1186/s12951-017-0289-y

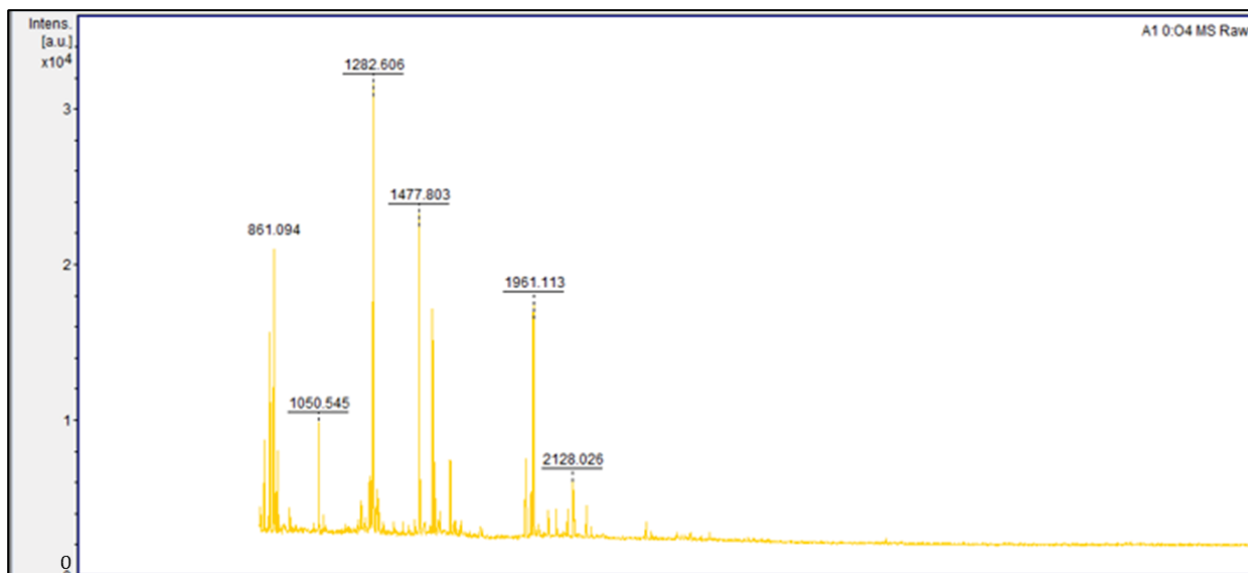
- THIRUPPATHI, R.; MISHRA, S.; GANAPATHY, M.; PADMANABHAN, P.; GULYÁS, B. Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging. **Advanced Sciences New**. V. 4, p. 1465–1475. 2016.
- TIAN, J.; JIA, R.; WENGE, D.; SUN, H.; WANG, Y.; CHANG, Y.; LUO, H. One-step purification and immobilization of recombinant proteins using SpyTag/SpyCatcher chemistry. **Biotechnology Letters**. v. 43, p. 1075–1087. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03098-x>.
- TOMA, H. E. Nanotecnologia molecular: materiais e dispositivos. 1 ed. v. 06. São Paulo: **Blucher**. p. 336. 2016.
- TOPOGLIDIS, E.; CAMPBELL, C. J.; CASS, A. E. G.; DURRANT, J. R. Factors that Affect Protein Adsorption on Nanostructured Titania Films. A Novel Spectroelectrochemical Application to Sensing. **Langmuir**. V. 17, p. 7899-7906. 2001.
- TORTAJADA, M.; DA SILVA, L.F.; PRIETO, M.A. Second-Generation functionalized medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: The gateway to high-value bioplastic applications. **Int. Microbiol.** v. 16, p. 1–15.2013.
- TREGONING, J. S.; BROWN, E. S.; CHEESEMAN, H. M. *et al.* Vaccines for COVID-19. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 202, n. 02, p. 162–192. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/cei.13517>
- TSUTAKAWA, S.E.; HURA, G.L.; FRANKEL, K.A.; COOPER, P.K.; TAINER, J.A. Structural analysis of flexible proteins in solution by small angle X-ray scattering combined with crystallography. **Journal of Structural Biology**, v. 158, p. 214-223, 2007.
- UCHINO, K.; SAITO, T.; JENDROSSEK, D. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 1058-1063, 2008.
- VALO, H. K.; IVI, P.; LAAKSONEN, H.; PELTONEN, L. J.; LINDER, M. B.; HIRVONEN, J. T.; LAAKSONEN, T. J. Multifunctional Hydrophobin: Toward Functional Coatings for Drug Nanoparticles. **ACS Nano**. v. 04, n. 03, p. 1750-1758. 2010.
- VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Biopolymers: Overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer Testing**, 2002.
- VERNE, E.; BAROUTIB, G.; JARNOUEN, K. *et al.* Opsonisation of nanoparticles prepared from poly(β -hydroxybutyrate) and poly(trimethylene carbonate)- β -poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact on the *in vitro* cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 513, p. 438–452. 2016.
- VERHEUL, R. J.; SLUTTER, B.; BAL, S. M.; BOUWSTRA, J. A.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E. Covalently stabilized trimethyl chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for nasal and intradermal vaccination. **J Control Release**. V. 156, p. 46-52. 2011.
- VIEYRA, H. *et al.* Cytotoxicity and biocompatibility of biomaterials based in polyhydroxybutyrate reinforced with cellulose nanowhiskers determined in human peripheral leukocytes. **Biomedical Materials**, v. 13, n. 4, p. 045011, 2018.
- VILLELA, S. M. A.; KRAIEM, H.; BOUHAOUALA-ZAHAR, B.; BIDEAUX, C.; LARA, C. A. A.; FILLAUDEAU, L. A protocol for recombinant protein quantification by densitometry. **Microbiology Open**. v. 09, n. 06. 2020.
- WAKADKAR, S.; HERMAWAN, S.; JENDROSSEK, D.; PAPAGEORGIU, A. The structure of PhaZ7 at atomic (1.2 Å) resolution reveals details of the active site and suggests a substrate-binding mode. **Acta Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 66, n. 6, p. 648-654. 2010. DOI: 10.1107/S174430911001434X.
- WAMMES, A. E. M.; FISCHER, M. J. E.; MOL, N. J.; ELDIJK, M. B. V.; RUTJES, F.; HEST, J. M. C. V.; DELF, F. L. V. Site-specific peptide and protein immobilization on surface plasmon resonance chips via strain-promoted cycloaddition. **Lab Chip**, v. 13, p. 1863-1867. 2013.
- WANG, Q.; TAPPEL, R.C.; ZHU, C.; NOMURA, C.T. Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 78, p. 519–527. 2012.

- WANG, X.; JIANG, X. R.; WU, F.; MA, Y.; CHE, X.; CHEN, X.; LIU, P.; ZHANG, W.; MA, X.; CHEN, G. Q. Microbial poly-3-hydroxybutyrate (PHB) as a feed additive for fishes and piglets. **Biotechnol. J.**, v. 14, [S. n.]. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201900132>
- WANG, Z.; WU, H.; CHEN, J. *et al.* A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic polyhydroxyalkanoate nanoparticles. **Lab on a Chip**, v. 8, p. 1957-1962. 2008.
- WIBOWO, D.; JORRITSMA, S. H. T.; GONZAGA, Z. J. *et al.* Polymeric nanoparticle vaccines to combat emerging and pandemic threats. **Biomaterials**, v. 268, n. 120597. 2021.
- WINGFIELD, P. T. Protein precipitation using Ammonium Sulfate. **Curr. Protoc. Protein Sci.** [S. n.]. 2001.
- WU, Y.; WANG, F.; SHEN, C. *et al.* A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. **Science**, v. 368, n. 6496, p. 1274 - 1278. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abc2241>
- XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**. V. 6, p. 112–115. 2008.
- YAMADA, M. *et al.* Autoregulator protein PhaR for biosynthesis of polyhydroxybutyrate [P(3HB)] possibly has two separate domains that bind to the target DNA and P(3HB): Functional mapping of amino acid residues responsible for DNA binding. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 1118–1127, 2007.
- YANG, H.; YANG, S.; KONG, J. *et al.* Obtenção de informações sobre estruturas secundárias de proteínas em solução aquosa usando espectroscopia IR com transformada de Fourier. **Nat Protoc.** n. 10, p. 382–396. 2015. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>
- YAO, Y. C.; ZHAN, X. Y.; ZHANG, J. *et al.* A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. **Biomaterials**, v. 29, n. 36, p. 4823-4830. 2008.
- YLINEN, A.; RUIJTER, J. C.; JOUHTEN, P.; PENTTILA, M. PHB production from cellobiose with *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**. v. 21, n. 124. 2022.
- YU, M.; WU, J.; SHI, J. *et al.* Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 24-37. 2016.
- ZAGHARY, W. A.; ELANSARY, M. M.; SHOUMAN, D. N. Can nanotechnology overcome challenges facing stem cell therapy? A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, n. 102883. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102883>
- ZHANG, F.; RICHTER, G.; BOURGEOIS, B.; SPREITZER, E.; MOSER, A.; KEILBACH, A.; KOTNIK, P.; MADL, T. A. General Small-Angle X-ray Scattering-Based Screening Protocol for Studying Physical **Stability of Protein Formulations**. **Pharmaceutics**. v. 14, n. 169. 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics14010069
- ZHANG, J.; YAMAGUCHI, S.; NAGAMUNE, T. Sortase A-mediated synthesis of ligand-grafted cyclized peptides for modulating a model protein-protein interaction. **Biotechnol. Journal**. v. 10, p. 1499–1505. 2015.
- ZHANG, L.; CHOU, C. P.; MOO-YOUNG, M. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by *Escherichia coli* expression system. **Biotechnology Advances**. V. 29; p. 923–929. 2011. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.013
- ZHANG, X.; ZHAO, X.; LUCKANAGUL, J. A. *et al.* Nanopartículas de polímero-proteína core-shell para imunogenicidade aprimorada de antígeno. **ACS Macro Lett.**, v. 6, n. 4, p.442-444. 2017.
- ZHAO, H.; WEI, H.; LIU, X. *et al.* Structural Insights on PHA Binding Protein PhaP from *Aeromonas hydrophila*. **Scientific Reports**, v. 06, n. 39424, p. 1-13. 2016. DOI: 10.1038/srep39424.
- ZHENG, Y.; CHEN, J. C.; MA, Y. M.; CHEN, G. Q. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. **Metabolic Engineering**. V. 58, p. 82-93. 2020.
- ZHUANG, Z.; SONG, F.; ZHAO, H.; LI, L.; CAO J.; EISENSTEIN, E.; HERZBERG, O.; DUNAWAY-MARIANO, D. Divergence of function in the hot dog fold enzyme superfamily: the bacterial thioesterase YciA. **Biochemistry**, v. 47, p. 2789-2796, 2008.
- ZHUIKOVA, Y.; ZHUIKOV, V.; VARLAMOV, V. Biocomposite Materials Based on Poly(3-hydroxybutyrate) and Chitosan: A Review. **Polymers**. v. 14, n. 5549. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14245549>

ZOHRI, M. Polymeric NanoParticles: production, applications and advantage. **Internet J. Nanotechnol.** V. 03. 2009.

ANEXO I

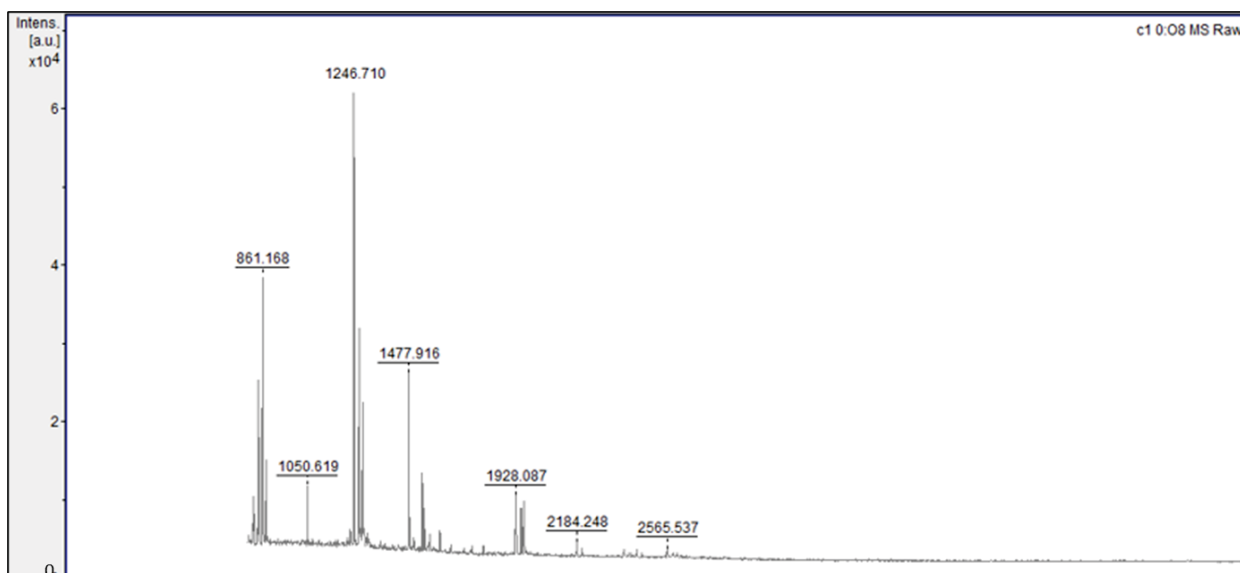
Espectrogramas e lista de massa/carga (m/z) dos peptídeos obtidos a partir da tripsinização da proteína **sfGFP-SBD** (banda de 33,6 kDa) para identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS).



Mass List - 30 Peaks			
m/z	S/N	Quality Fac.	
804.408	7	419	
821.423	24	4784	
843.402	10	208	
845.124	50	16971	
847.113	8	267	
861.094	69	28115	
867.103	10	674	
877.065	20	3576	
928.422	8	761	
1050.545	28	24947	
1231.636	9	3157	
1266.609	15	2869	
1274.664	13	2270	
1282.606	112	151356	
1298.603	13	3801	
1304.588	9	1429	
1477.803	85	166036	
1533.866	60	84790	
1542.830	21	8594	
1564.809	7	839	
1608.762	25	12400	
1927.955	27	27247	
1949.935	14	5145	
1961.113	74	125300	
2023.004	10	1837	
2056.999	9	1914	
2104.966	9	2293	
2128.026	21	7416	
2132.992	8	1336	
2184.110	11	2805	

ANEXO II

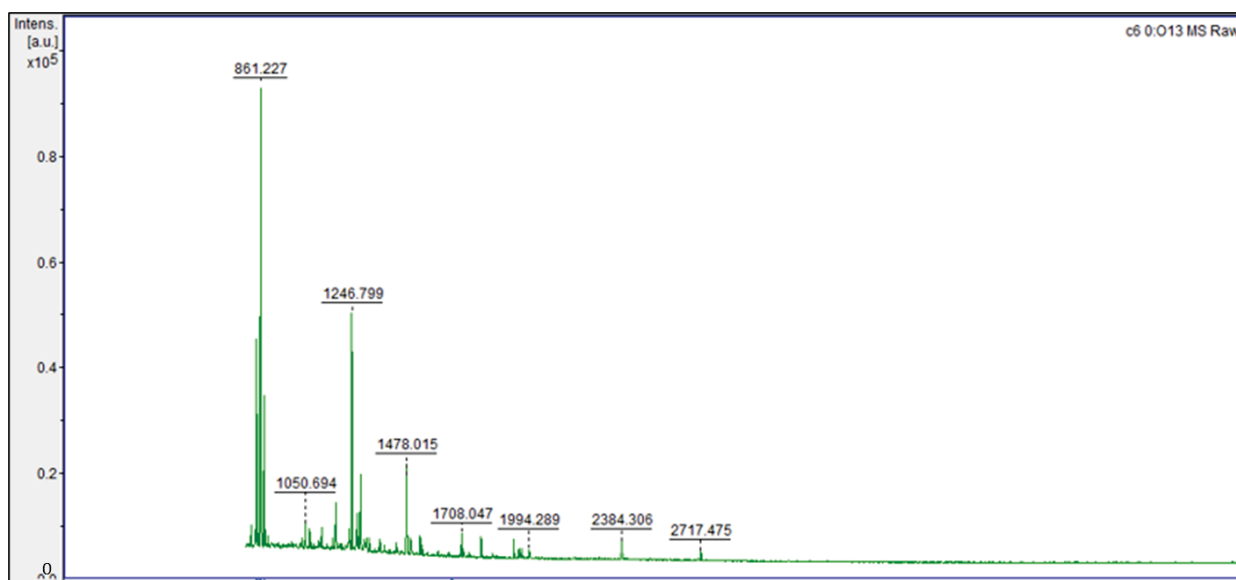
Espectrogramas e lista de massa/carga (m/z) dos peptídeos obtidos a partir da tripsinização da proteína **sfGFP-sSBD** (banda de 33,2 kDa) para identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS).



Mass List - 23 Peaks			
m/z	S/N	Quality Fac.	
821.487	12	909	
825.200	13	1279	
841.167	6	570	
843.480	9	610	
845.193	46	5759	
847.197	7	225	
861.168	73	13635	
877.139	25	1198	
1050.619	18	4215	
1246.710	143	104481	
1266.700	67	70320	
1268.687	16	1589	
1282.690	44	71346	
1477.916	64	84783	
1533.983	30	22109	
1542.948	17	4987	
1564.936	7	1031	
1608.870	9	2985	
1928.087	30	24735	
1950.082	24	29376	
1961.251	25	8608	
2184.248	8	2072	
2565.537	6	1000	

ANEXO III

Espectrogramas e lista de massa/carga (m/z) dos peptídeos obtidos a partir da tripsinização da proteína **sfGFP-sSBD** (banda de 30 kDa) para identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS).



Mass List - 35 Peaks			
m/z	S/N	Quality Fac.	
821.555	8	396	
839.243	8	434	
845.249	69	11414	
847.243	10	445	
855.213	7	663	
861.227	146	60282	
867.241	6	169	
877.201	50	8484	
883.211	7	169	
893.181	6	628	
1050.287	9	584	
1050.694	9	1400	
1066.243	9	443	
1072.255	8	345	
1118.684	9	1322	
1179.796	17	9407	
1234.879	9	639	
1246.799	92	163037	
1266.787	15	7095	
1268.780	8	1209	
1277.916	8	445	
1282.781	31	25701	
1320.792	6	687	
1476.001	17	5492	
1478.015	36	33231	
1493.983	9	1536	
1534.080	10	4210	
1708.047	13	3969	
1792.020	12	3933	
1928.209	13	4701	
1950.199	7	2099	
1961.372	8	1659	
1994.289	6	1337	
2384.306	18	5449	
2717.475	10	2414	

ANEXO IV

Estrutura primária da proteína sfGFP-SBD:

>MRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLTLYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEV
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNHSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMLLEFVTA
AGITHGMDELKGLTTKSAFTCTATTASNYAHVQAGRAHDSGGIAYANGSNQSMGL
DNLFYTSTLAQTAAGYYIVGNCPLLEHHHHHH*¹

Estrutura primária da proteína sfGFP-sSBD:

>MRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLTLYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEV
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNHSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMLLEFVTA
AGITHGMDELKGLASNYAHVQAGRAHDSGGIAYANGSNQSMGLDNLFYTSTLAQ
TAAGYYIVGNCPLLEHHHHHH*¹

Estrutura primária da proteína sfGFP-sSBDA:

>MRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLTLYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEV
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNHSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMLLEFVTA
AGITHGMDELKGLASNYAHVQAGRAHDSGGIAYANGSNQSMGLDNLFYTSTLAQ
TAAGYYIVGNAPLEHHHHHH*¹

Estrutura primária da proteína sfGFP:

>MRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLTLYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEV
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNHSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMLLEFVTA
AGITHGMDELKGL*

¹ A porção da cadeia cuja sequência de resíduos aparece sublinhada indica a presença do domínio de ligação ao substrato (PHB). Neste caso, os domínios SBD e variantes. O asterisco (*) representa o códon de parada.