

## MICROESFERAS DE ALBUMINA (BSA) CARREGADAS COM NANOPARTÍCULAS DE SELÊNIO COM POTENCIAL ANTIBACTERICIDA E ANTIVIRAL

Eloise Marengoni (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Mariana dos Santos Cortez (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Marcos Rogério Guilherme, Jaqueline de Carvalho Rinaldi (Co-orientador), Andrelson Wellington Rinaldi (Orientador),  
e-mail: [ra106918@uem.br](mailto:ra106918@uem.br), e-mail: [ra114926@uem.br](mailto:ra114926@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.

10600000 Química - 10602003 Química Inorgânica

**Palavras-chave:** Nanopartículas, atividade antimicrobiana, microesferas.

### Resumo:

Nanopartículas são alternativas viáveis para sistemas de liberação, pois, apresentam liberação direcionada e controlada, baixa toxicidade, entre outras. Especificamente, as nanopartículas de selênio, atuam como antitumorais, bom desempenho perante funções antivirais e antibactericidas. Sendo assim, as micropartículas de albumina de soro bovino (BSA), atuam para que as nanopartículas sejam viáveis e não se desintegram antes de atingir o sítio de ação. Este trabalho relata o processo de síntese de microesferas de BSA para liberação controlada de nanopartículas de selênio com a finalidade de atuar como espécie antiviral e antibactericida.

### Introdução

Algumas propriedades funcionais e moleculares das proteínas, por exemplo as *whey proteins*, conseguem atuar na fabricação de sistemas de encapsulação e liberação de drogas<sup>[1]</sup>.

O soro do leite, é constituído de alguns tipos de proteínas, isto é, o BSA, a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LA),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ LA), glico-macropéptídeos (GMP) e imunoglobulinas (Ig's)<sup>[2]</sup>. Ao serem aquecidas, suas zonas hidrofóbicas serão desdobradas, expondo resíduos de cisteína, formando pontes dissulfeto através de interações de hidrogênios e/ou interações hidrofóbicas. Se atingir uma alta concentração de albumina, em pH longe do ponto isoelétrica e repulsões eletrostáticas fortes, podem formar géis transparentes e homogêneos<sup>[3]</sup>.

Ademais, para que o material possua atividade antiviral ou antimicrobiana, optou-se por nanopartículas de selênio (NpSe), sintetizadas a partir de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) na presença de ácido ascórbico. Além disso, as NpSe possuem propriedades antibactericidas contra *P. aeruginosa* e *Candida sp*<sup>[4]</sup>. As nanopartículas de selênio possuem a vantagem de serem utilizadas no estado de oxidação zero ( $\text{Se}^0$ ), tendo baixa

toxicidade e biodisponibilidade quando comparada a outros estados de oxidação e.g.  $\text{Se}^{+4}$ ,  $\text{Se}^{+6}$ [5].

## **Materiais e métodos**

### *Materiais*

Selenito de sódio (50mM), poli (álcool vinílico), (98 - 99% hidrolizado) sendo 0%, 1% e 2%, ácido ascórbico (50mM), Albumina de soro bovino (BSA), anidrido maleico (AM), acetona, N-N dimetilacrilamida (DMAAm), álcool benzílico, persulfato de amônia, TEMED.

### *Métodos*

#### 1. Síntese das nanopartículas de selênio (NpSe)

Baseando-se no trabalho de Boroumand et al, a síntese das NpSe foi realizada a partir da redução química do selenito de sódio pelo ácido ascórbico na presença do PVA como agente estabilizante. Em temperatura ambiente, soluções de selenito de sódio (50 mM) e PVA (0,1%) foram misturados por 5 min em agitador magnético. Em seguida, adicionou-se solução ácido ascórbico (50 mM) gota a gota, e agitou-se por mais 30 min para concluir a reação de redução. A coloração da solução passou de transparente para avermelhado, evidenciando a formação de NpSe.

#### 2. Funcionalização da Albumina de Soro Bovino (BSA)

Baseando-se no trabalho de Sitta et al (2014), a solução de funcionalização da proteína foi preparada a partir de 0,5g de BSA e 0,05g de anidrido maleico em uma solução tampão de fosfato (0,1 M) com pH 5,5 sob agitação. Ao homogeneizar, a solução continua em agitação por 3 h a 37°C. O produto foi precipitado com acetona fria (2°C) e mantido refrigerado.

#### 3. Síntese das micropartículas proteicas utilizando BSAAM e DMAAm

Foram adicionados 0,1 g de BSAAM em 5,0 mL de solução tampão de fosfato em pH 7,0 e 20°C sob agitação. As soluções tampão foram preparadas utilizando diferentes concentrações de PVA (agente estabilizante) – 0%, 1% e 2% (m/v). Após, 52  $\mu\text{L}$  de DMAAm foram adicionados à solução sob atmosfera inerte. Após a mistura se tornar translúcida, 20 mL de álcool benzílico foi adicionado, gota a gota, sob agitação constante, formando uma emulsão. Após 30 min adicionou-se 0,02 g de persulfato de amônia e 12,5  $\mu\text{L}$  de TEMED, e a solução permaneceu em ultrasonicador. O produto foi precipitado com etanol frio (2°C), separado por centrifugação a 4000 rpm e lavado três vezes com água deionizada.

#### 4. Carregamento das micropartículas de BSA com NpSe

O carregamento foi realizado utilizando o método in situ, ou seja, as NpSe foram adicionadas, durante o processo de síntese das microesferas proteicas, à solução inicial de solução tampão de fosfato pH 7,0 e 0,1 g de BSAAM, numa proporção de 10% (m/m), ou seja, 0,01g de NpSe.

#### 5. Ensaio de citotoxicidade

Células da linhagem VERO foram empregadas para realização do teste de citotoxicidade conforme descrito pelo trabalho de Lima et al. (2019)<sup>(6)</sup>. Em resumo,  $2 \times 10^5$  células foram suspendidas em 1,0 mL de DMEM (Gibco, MO, USA) sem penicilina/streptomina. A suspensão foi

distribuída em placa de 96 poços (TPP) e cultivadas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> atmosférico *overnight*. Os poços foram lavados 2x com tampão fosfato (PBS), e expostos ao gel + NP sem PVA nas concentrações de 1 a 1000 µg/mL por 24 h. Células não tratadas foram usadas como controle. As placas foram incubadas com o kit de citotoxicidade (Promega, WI, USA) no escuro por 3 h. A absorbância do formazan foi monitorada em 490 nm usando espectrofotômetro ASYS (Biochrom, MA, USA). O cálculo da porcentagem de viabilidade celular (% CV) foi determinado empregando a Equação: % CV = (At/Ac) × 100, sendo que At e Ac referem-se a absorbância da substância teste e controle (células não tratadas) respectivamente [Malich et al., 1997]<sup>(7)</sup>.

## Resultados e Discussão

A síntese química das NpSe foi realizada de acordo com HOSNEDLOVA (2018), na qual ocorreu mudança perceptível da coloração da solução de selenito de sódio, saindo de incolor para avermelhado translúcido, indicando, portanto, sucesso da reação, como mostra a Figura 1.



Figura 1. Síntese de NpSe.

A reação de modificação da albumina (BSA) foi baseada no trabalho de SITTA, et al. (2014). Na qual ocorreu a reticulação da amostra contendo 0%, 1% e 2% de PVA e carregada *in situ* com 10% (m/v) de NpSe, conforme ilustrado na Figura 2.



Figura 2. Imagens das amostras preparadas com: 0%, 1% e 2% PVA e carregamento *in situ* de NpSe 10% (m/v).

O ensaio de citotoxicidade demonstrou que as células VERO apresentaram viabilidade superior a 100%, após 24 h expostas a alta concentração dos compostos (Tabela 1). Este resultado sugere que o composto não apresenta toxicidade *in vitro*. Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo tratado e não tratado.

Tabela 1: Ensaio de Citotoxicidade usando células VERO.

Compostos	% viabilidade celular (1000µg/mL)	% viabilidade celular (500µg/mL)	% viabilidade celular (250µg/mL)	% viabilidade celular (125µg/mL)	% viabilidade celular (1µg/mL)	IC <sub>50</sub>
Gel + NP sem PVA	107,1	107,4	109,3	106,1	108,2	>1000 µg/mL

Vale destacar que em decorrência da pandemia de COVID-19, não foi possível a realizar todas as caracterizações físico-químicas das amostras, contudo os resultados existentes são suficientes para um estudo inicial e otimização do processo de síntese das amostras.

## Conclusões

As NpSe ao serem sintetizadas concomitantemente com micropartículas de albumina de soro bovino (BSA), conseguem atuar em sistemas de liberação de fármacos, pois, apresentam boa biodisponibilidade e baixa toxicidade, sem ocorrer a sua desintegração antes de atingir o sítio de ação. Ademais, conseguem atuar como agentes antitumorais, e apresentarem funções antibactericidas e antivirais. Por fim, a síntese dos materiais de partida foram bem sucedidas.

## Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária, à CAPES/CNPq e à Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade do primeiro contato com a pesquisa científica. Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Andrelson W. Rinaldi, por todo o suporte e aprendizado durante a vigência deste Programa. Agradeço ainda aos meus colegas de laboratório por todo o auxílio durante este tempo.

## Referências

- [1] FATHI, M.; DONSI, F.; MCCLEMENTS, D. J. Protein-Based Delivery Systems for the Nanoencapsulation of Food Ingredients. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, 4 (2018) 920.
- [2] HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, 4 (2006) 479.
- [3] DONATO, L.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J. L. Influence of the NaCl or CaCl<sub>2</sub> Concentration on the Structure of Heat-Set Bovine Serum Albumin Gels at pH 7. **Biomacromolecules**, v. 6 (2005) 2157.
- [4] CREMONINI, E.; ZONARO, E.; DONINI, M.; LAMPIS, S.; BOARETTI, M.; DUSI, S.; MELOTTI, P.; LLEO, M. M.; VALLINI, G. Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. **Microbial Biotechnology**, v. 9(6) (2016) 758.
- [5] TORRES, S. K.; CAMPOS, V. L.; LEÓN, C. G. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. **J Nanopart Res.** v.14, 11 (2012) 1236.
- [6] DE LIMA, H. H. C.; DA SILVA, C. T. P.; KUPFER, V. L.; DE CARVALHO RINALDI, J.; KIOSHIMA, E. S.; MANDELLI, D.; GUILHERME, M. R.; RINALDI, A. W. Synthesis of resilient hybrid hydrogels using UiO-66 MOFs and alginate (hydroMOFs) and their effect on mechanical and matter transport properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 251 (2021) 116977.
- [7] MALICH, G.; MARKOVIC, B.; WINDER, C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. **Toxicology** 124, 3 (1997) 179.