

JAQUELINE DE PAULA REZENDE

**NANOSSENSOR DE POLIDIACETILENO/COPOLÍMERO TRIBLOCO
PARA DETECÇÃO DE ALBUMINA DO SORO BOVINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R467n
2015

Rezende, Jaqueline de Paula, 1991-

Nanossensor de polidiacetileno/copolímero tribloco para
detecção de albumina do soro bovino / Jaqueline de Paula
Rezende. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ana Clarissa dos Santos Pires.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

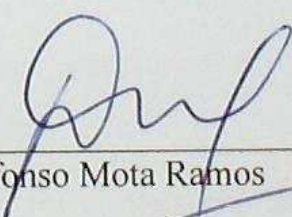
1. Materiais nanoestruturados. 2. Nanoestruturas.
3. Sensores. 4. Polidiacetileno. 5. Copolímero tribloco.
6. Albumina. 7. Proteínas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 620.5

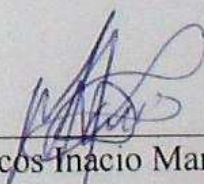
**NANOSSENSOR DE POLIDIACETILENO/COPOLÍMERO TRIBLOCO
PARA DETECÇÃO DE ALBUMINA DO SORO BOVINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

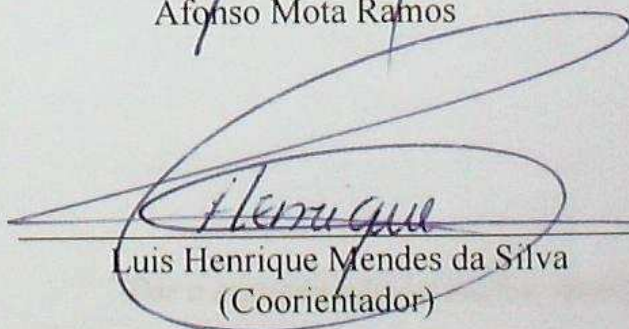
APROVADA: 21 de julho de 2015.



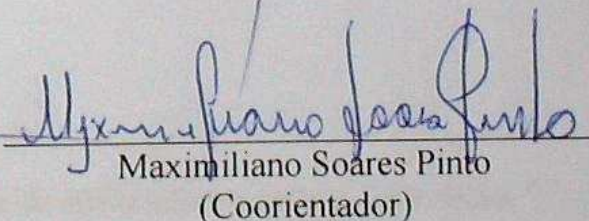
Afonso Mota Ramos



Marcos Inacio Marcondes



Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)



Maximiliano Soares Pinto
(Coorientador)



Ana Clarissa dos Santos Pires
(Orientadora)

“Dar o exemplo não é a melhor maneira de influenciar os outros – é a única.”

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar comigo sempre, ser meu melhor amigo, por guiar meus passos e me dar força para superar as dificuldades.

À Universidade Federal de Viçosa, através do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto

À professora Ana Clarissa, pela orientação, amizade e confiança depositada em mim desde a graduação, pelo exemplo de pessoa e profissional... sem dúvidas, contribuiu de maneira fundamental não só para a realização desse trabalho, mas também para o meu crescimento durante esses anos.

Ao professor Luis Henrique Mendes da Silva, pela coorientação, pelos valiosos conselhos e sugestões, pela confiança, pela dedicação e disponibilização de equipamentos.

À professora Carminha e toda equipe do laboratório QUIVECOM, pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao professor Maximiliano Soares Pinto, pela disponibilidade e coorientação.

Aos professores Afonso Mota Ramos e Marcos Inácio Marcondes por aceitarem participar desta banca de defesa.

Aos meus pais Luiz Carlos e Adair, pelo amor, apoio, confiança, por serem meus exemplos de determinação e pela motivação incondicional. Às minhas queridas irmãs Cristiane e Juliana, pelo amor, carinho e apoio de sempre. Ao Dimas, pelo amor, apoio, ajuda e amizade. Vocês serão sempre as razões de todos os meus esforços e motivos das minhas vitórias. À vocês, dedico esse trabalho!

Às minhas amigas de laboratório Ana Flávia, Carla, Carine, Eliara, Natália e Silvânia pelo companheirismo, pelas risadas e momentos de estudo. Agradeço em especial à Ana Beatriz, que me ajudou durante a execução deste trabalho.

Aos meus amigos de Viçosa, pelos momentos de descontração, conselhos e conversas... levarei a amizade de vocês pra toda a vida.

À todos que contribuíram de alguma forma para essa conquista, muito obrigada!

BIOGRAFIA

JACQUELINE DE PAULA REZENDE, filha de Luiz Carlos de Paula Pedro e Adair Vieira de Paula Rezende, nasceu em Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais, em 10 de fevereiro de 1991.

Em 2009 iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em agosto de 2013.

Em agosto de 2013 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em julho de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Polidiacetileno.....	4
3.2 Albuminas do soro	13
3.3 Técnicas experimentais para o estudo de interação entre a BSA e nanoblendas polidiacetilênicas.....	16
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
POLYDIACETYLENE/TRIBLOCK COPOLYMER NANOSENSOR FOR THE DETECTION OF NATIVE AND FREE BOVINE SERUM ALBUMIN	43
1 Introduction	43
2 Materials and Methods	45
2.1 Materials	45
2.2 Nanoblend Production	46
2.3 Colorimetric response (CR)	46
2.4 Light scattering and electrokinetic measurements.....	47
2.5 Fluorescence Experiments	47
2.6 Isothermal titration microcalorimetric (IT μ C) experiments.....	47
2.7 Differential scanning nanocalorimetric (Nano-DSC) experiments.....	48
3 Results and discussion	48
3.1 Optical properties of polydiacetylenic nanostructures	48
3.2 Polydiacetylene nanoblend as optical nanosensor for BSA.....	51
3.3 The effect of polydiacetylene chain length on sensor properties of nanoblends	63
3.4 Effect of the three-dimensional structure of BSA on the sensor properties of nanoblends	67
3.5 Effect of eugenol-BSA complex formation on interaction between protein and nanoblends	68
3.6 Effect of BSA-nanoblend interaction on protein conformation energy change	70

Conclusions.....	72
Acknowledgements.....	72
References	73

RESUMO

REZENDE, Jaqueline de Paula, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Nanossensor de polidiacetileno/copolímero tribloco para detecção de albumina do soro bovino.** Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Maximiliano Soares Pinto.

A detecção da albumina do soro bovino (BSA) tem atraído interesse da comunidade científica em razão da sua aplicação em diversas áreas como alimentícia, farmacêutica e bioquímica. Diante disso, identificar e quantificar a BSA em diferentes matrizes torna-se muito importante. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver nanoblendas de polidiacetileno e copolímero tribloco (L64) para detecção de BSA, bem como avaliar a interação entre as nanoestruturas e a proteína. A fim de caracterizar a interação entre o nanossensor desenvolvido e a BSA, a influência de alguns fatores foi investigada tais como, a composição da nanoblenda (com e sem colesterol), o comprimento da cadeia do polidiacetileno utilizado na síntese (PCDA ou TCDA), a conformação da BSA (nativa e desnaturada) e a disponibilidade do domínio hidrofóbico (BSA livre e BSA ligada ao eugenol). O estudo termodinâmico de interação BSA-nanoblenda foi feito por meio de técnicas espectrofotométricas, calorimétricas, dispersão dinâmica de luz e medidas eletrocinéticas. Nanoblendas de polidiacetileno/L64 detectou BSA em pequenas quantidades apresentando resposta colorimétrica (RC) de 34%. A adição de colesterol na nanoestrutura tornou o sensor mais sensível, aumentando a RC para 65%. Os sensores desenvolvidos possibilitou a diferenciação visual entre a proteína nativa e desnaturada, por meio da transição azul-vermelho. A adição do complexo eugenol-BSA não causou mudança colorimétrica nas nanoblendas. A obtenção da energia livre padrão de Gibbs ($-10,44 < \Delta G^\circ < -49,52 \text{ kJ mol}^{-1}$), da estequiometria do complexo ($1 < "n" < 3$) e constante de interação ($6,7 \times 10^2 < K_a < 4,79 \times 10^8 \text{ mol L}^{-1}$) da formação do complexo BSA-nanoblenda, permitiu estabelecer uma relação direta entre a resposta do nanossensor e interação BSA-nanoblenda. A transição colorimétrica da nanoblenda de polidiacetileno/L64 foi induzida pelo aumento da entropia, enquanto a presença do colesterol tornou o processo entalpicamente dirigido devido, principalmente, à interação específica entre o colesterol e BSA ($-42,00 < \Delta_{\text{ap-int}}H < 28,00 \text{ kJ mol}^{-1}$). A substituição do PCDA por TCDA aumentou a sensibilidade do nanossensor devido à menor energia de barreira rotacional em razão do TCDA possuir dois átomos de carbono a menos em sua cauda hidrofóbica.

Diante disso, o sensor sintetizado demonstrou ser eficaz para detecção de pequenas quantidades de BSA além de ser capaz de discriminar entre proteína nativa/desnaturada e livre/ligada.

ABSTRACT

REZENDE, Jaqueline de Paula, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Polydiacetylene/triblock copolymer nanosensor for detection bovine serum albumin.** Adviser: Ana Clarissa dos Santos Pires. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Maximiliano Soares Pinto.

The detection of bovine serum albumin (BSA) has attracted interest from the scientific community because of their application in areas such as food, pharmaceutical and biochemistry. Therefore, identify and quantify BSA in different matrices become very important. In this context, the aim of this study was to develop nanoblends of polidiacetileno and triblock copolymer (L64) to BSA detection and evaluate the interaction between nanostructures and protein. In order to characterize the interaction between nanosensor developed and BSA, the influence of some factors was investigated such as, the nanoblend composition (with and without cholesterol), the length of the chain polydiacetylene used in the synthesis (PCDA or TCDA), the BSA conformation (native and denatured) and the availability of the hydrophobic domain (free BSA and eugenol-bound BSA). The thermodynamic study BSA-nanoblend interaction was done using spectrophotometric techniques, calorimetric, light scattering and electrokinetic measurements. Polydiacetylene/L64 nanoblends detected small amounts of BSA showing colorimetric response (CR) of 34%. Cholesterol addition in the nanostructure became sensor more sensitive, increasing the RC to 65%. The developed sensors allowed the visual differentiation between the native and denatured protein, through the blue-red transition. The addition of eugenol-BSA complex did not cause nanoblend colorimetric change. Obtaining the standard Gibbs free energy ($-10.44 < \Delta G^\circ < -49.52 \text{ kJ mol}^{-1}$), the stoichiometry complex ($1 < "n" < 3$), and interaction constant ($6.7 \times 10^2 < K_a < 4.79 \times 10^8 \text{ mol L}^{-1}$) of BSA-nanoblend complex formation, allowed to establish a direct relation between nanosensor response and BSA-nanoblend interaction. The colorimetric transition of polydiacetylene/L64 nanoblend was induced by the increase of entropy, while the cholesterol presence made the enthalpically driven process, mainly due to the specific interaction between cholesterol and BSA ($-42.00 < \Delta_{\text{ap-int}}H < 28.00 \text{ kJ mol}^{-1}$). The replacement of PCDA for TCDA increased the nanosensor sensitivity due to smaller rotational barrier energy because of TCDA having two less carbon atoms in its hydrophobic tail. Therefore, the synthesized sensor demonstrated to be effective for detecting small

amounts of BSA addition to being able to discriminating between native/denatured and free/bound protein.

1 INTRODUÇÃO

Albuminas do soro são as proteína solúveis mais abundante do sistema circulatório, exercendo importantes funções biológicas e farmacocinéticas. Elas são capazes de se ligarem reversivelmente a uma grande variedade de ligantes endógenos e exógenos relativamente insolúveis. Diante disso, elas desempenham o papel principal no transporte sanguíneo de diversos metabólitos tais como, nutrientes, hormônios, vitaminas, aminoácidos, ácido graxo e uma variedade de fármacos.

A albumina do soro bovino (BSA) é uma proteína globular que corresponde a cerca de 1,5% da proteína total do leite e 8% da fração de proteínas do soro de leite de bovino. Essa proteína tem atraído cada vez mais atenção dos pesquisadores, principalmente devido à aplicação em diversas áreas, tais como alimentícia, farmacêutica e bioquímica. Além disso, esta proteína tem sido usada como marcador da qualidade do leite, tem potencial alergênico e pode ser usada como transportador de moléculas hidrofóbicas em matrizes alimentícias e fármacos. Portanto, identificar e quantificar a BSA em diferentes matrizes torna-se muito importante.

As técnicas tradicionais utilizadas na determinação de BSA geralmente são baseadas em métodos espectrométricos e muitas vezes são demoradas, possuem alto custo, demandam pessoal treinado e envolvem instrumentação complexa o que inviabiliza suas aplicações fora de laboratórios especializados.

Diante disso, o desenvolvimento de técnicas capazes de detectar rapidamente pequenas quantidades de BSA é essencial. Os sensores de polidiacetileno surgem como uma alternativa promissora em razão do baixo custo, simplicidade de manuseio e facilidade na interpretação do resultado.

Polidiacetilenos (PDAs) são polímeros alternados eno-ino formados pela adição 1-4 de monômeros diacetilênicos sob radiação ultravioleta, apresentando coloração azul intensa. Esses polímeros exibem propriedades colorimétricas únicas, absorvendo radiação com pico de absorção máxima em 640 nm e passando a absorver em 540 nm após algum estímulo externo, tais como pH, temperatura e interação com diversas moléculas. Essa transição espectrofotométrica, também conhecida como transição colorimétrica azul-vermelho, pode ser detectável visualmente e tem sido explorada em diversos estudos para desenvolvimento de sensores colorimétricos de compostos de interesse.

O mecanismo envolvido na transição colorimétrica desses polímeros ainda não é totalmente compreendido. Portanto, para explorar o potencial das estruturas polidiacetilênicas como sensores, é fundamental o conhecimento, em nível molecular, das interações existentes entre estas macromoléculas e a molécula de interesse.

Os PDAs podem se auto-organizar em diferentes estruturas, como monocamadas, multicamadas, vesículas, filmes moleculares (filmes de Langmuir) e nanoestruturas. Vesículas de PDA têm sido extensivamente estudadas para o desenvolvimento de sensores na detecção de moléculas de interesse. Apesar de essas estruturas apresentarem potencial de aplicação como sensores, existem alguns fatores limitantes para o seu emprego. Dentre esses fatores estão a interação com diversos compostos além da molécula alvo, a necessidade de manutenção das vesículas em suspensão, homogeneidade insuficiente e falta de domínio de sua composição e organização.

Diante dessas limitações do uso das vesículas como sensores, outras nanoestruturas vêm sendo desenvolvidas e propostas como sensores mais eficientes. Nanoestruturas chamadas de nanoblendas, formadas por polidiacetileno e copolímeros tribloco, têm sido desenvolvidas e consideradas mais estáveis e sensíveis à transição colorimétrica na presença de diferentes estímulos e moléculas.

Neste contexto, acredita-se que é possível desenvolver um sensor para detectar BSA baseado em nanoestruturas polidiacetilênicas auto-organizadas na forma de nanoblendas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver um nanossensor de polidiacetileno/copolímero tribloco para detecção de albumina do soro bovino.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a termodinâmica de interação entre albumina do soro bovino e nanoblendas de polidiacetileno/copolímero tribloco.
- Avaliar a resposta colorimétrica das nanoblendas de polidiacetileno (PDA)/copolímero tribloco (CT) na presença de diferentes concentrações de albumina do soro bovino (BSA).
- Determinar a variação de entalpia aparente de interação entre as nanoblendas e BSA.
- Determinar a constante de interação entre as nanoblendas de PDA/CT e BSA.
- Avaliar a variação do tamanho e do potencial zeta das nanoblendas de PDA/CT na presença de BSA.
- Determinar a temperatura média de desnaturação e a variação da entalpia de desnaturação da BSA, antes e após a interação com nanoblendas de PDA/CT.
- Avaliar o efeito do tamanho da cauda hidrofóbica do polidiacetileno na resposta colorimétrica das nanoblendas na presença da BSA.
- Determinar o efeito da presença de colesterol na sensibilidade das nanoblendas em razão da adição de BSA.
- Avaliar a influência da conformação da proteína e da presença de ligante na resposta colorimétrica das nanoblendas de PDA/CT e na interação proteína-nanossensor.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Polidiacetileno

Polidiacetilenos (PDAs) são polímeros alternados eno-ino formados pela adição 1,4 de monômeros diacetilênicos sob radiação ultravioleta (Figura 1). Após a radiação, obtém-se um polímero de coloração azul intensa (OKADA et al., 1998; SUN et al., 2010).

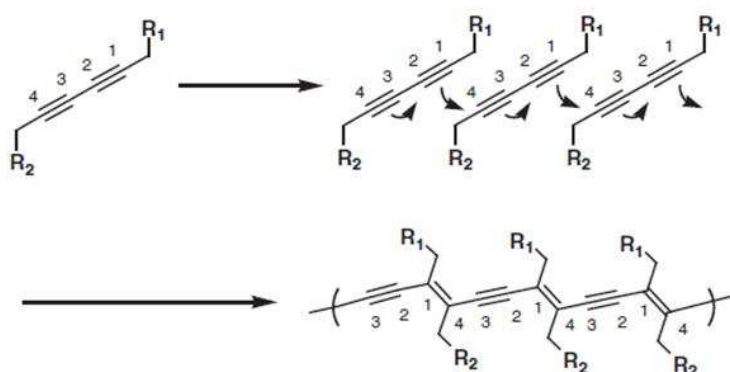


Figura 1: Representação esquemática da polimerização de monômeros diacetilênicos (Fonte: KIM et al., 2003).

Esses polímeros apresentam propriedades colorimétricas únicas, absorvendo radiação com pico de absorção máxima em 640 nm e passando a absorver em 540 nm após algum estímulo externo (Figura 2). Essa transição espectrofotométrica, também conhecida como transição colorimétrica azul-vermelho, muitas vezes é visível e tem sido explorada em diversos estudos para detecção de diversas alterações no sistema (OKADA et al., 1998; SHIN et al., 2015; SUN et al., 2010).

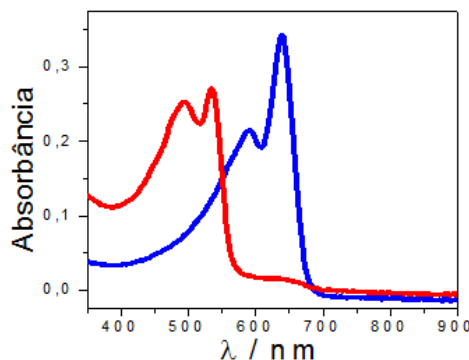


Figura 2: As curvas azul e vermelha são espectros eletrônicos do PDA antes e após a exposição à algum estímulo externo, respectivamente.

Existe uma variedade de estímulos externos capazes de provocar alteração colorimétrica nos PDAs tais como, pH (CHAROENTHAI et al., 2011; CHENG et al., 2000), solvente orgânico (PIRES et al., 2010a), temperatura (WANG et al., 2007; GOU et al., 2010), reconhecimento molecular (AHN et al., 2009; CHARYCH et al., 1993; PIRES et al., 2011; SOUZA, 2014), estresse mecânico devido à mudanças conformacionais na cadeia carbônica principal (NALLICHERI e RUBNER, 1991), dentre outros.

A compreensão do mecanismo envolvido na transição colorimétrica desses polímeros ainda não é bem definida. Algumas teorias sugerem uma conversão entre as formas diacetilênicas e butatriênicas (Figura 3). No entanto, alguns estudos evidenciam a presença da estrutura diacetilênica em ambas as formas (azul e vermelho) (CARPICK et al., 2004; ABDEL-FATTAH et al., 2012).

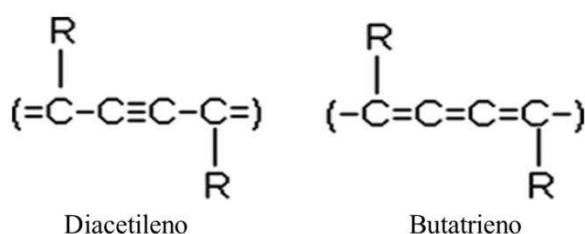


Figura 3: Esquema das estruturas de ressonância do polidiacetileno (Fonte: PIRES, 2010b).

Outra hipótese é que a alteração na absorvância espectral desses polímeros está relacionada à mudanças conformacionais moleculares, tais como empacotamento, ordenação e orientação da cadeia lateral, que transmitem tensões a estrutura do polímero e altera a sua conformação. Dessa forma, o mecanismo molecular envolvido na transição colorimétrica dos PDAs é relacionado à um processo cooperativo em que grupos funcionais são submetidos à rotação ao redor das ligações simples carbono-carbono (C-C) da cadeia principal π -conjugada do PDA e, conseqüentemente, ocorre o aumento do número de moléculas na configuração cis de maior energia (Figura 4). Assim, estas alterações conformacionais poderiam levar a mudanças no comprimento das ligações π -conjugadas e, conseqüentemente na absorção óptica correspondente (CARPICK et al., 2004; JELINEK e RITENBERG, 2013; NOPWINYUWONG et al., 2014 ; PIMSEN et al., 2014; PIRES et al, 2010b; WACHARASINDHU et al., 2010).

A interação entre os grupos laterais e a cadeia principal é muito importante já que, esta seria a responsável pelas torções provocadas na ligação C-C. Cálculos teóricos sugerem que uma pequena rotação dos grupos laterais em torno da ligação C-C daria origem a uma alteração significativa da sobreposição dos orbitais π e consequente transição colorimétrica (CARPICK et al., 2004; JELINEK e RITENBERG, 2013).

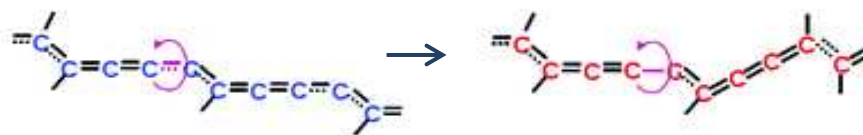


Figura 4: Representação esquemática da rotação ao redor das ligações C-C. (Fonte: JELINEK e RITENBERG, 2013).

A transição colorimétrica pode ser medida quantitativamente a partir da determinação da resposta colorimétrica (RC) proposta por Charych et al. (1993). A RC permite o cálculo da porcentagem de moléculas de PDA que converteram da forma azul para a forma vermelha em razão de algum estímulo.

Os monômeros de diacetileno (DA) são constituídos, geralmente, por uma cabeça polar e uma cauda carbônica hidrofóbica (CHAROENTHAI et al., 2011). Assim, os PDAs podem se auto-organizar em diferentes estruturas, como multicamadas, vesículas, filmes moleculares (filmes de Langmuir) e outras nanoestruturas (GUO et al., 2013; JIANG et al., 2010; JUNG e PARK, 2015; NARKWIBOONWONG et al., 2011; NOPWINYUWONG et al., 2014; WANG et al., 2015). Essa diversidade de formas de organização possibilita inúmeras aplicações como materiais sensores (PIRES et al., 2010b; van den HEUVEL et al., 2010; JELINEK e RITENBERG, 2013) e influenciam na RC dos sensores frente a diferentes estímulos (SOUZA, 2014).

Diante dessas características, os PDAs são considerados sistemas promissores para o desenvolvimento de sensores colorimétricos para a identificação simples e rápida de compostos de interesse (PIRES et al., 2010b; JELINEK e RITENBERG, 2013).

O potencial uso desses polímeros como moléculas sensoras foi proposto pela primeira vez por Charych et al. (1993). Nesse trabalho foi sintetizado um filme molecular de PDA incorporado com o análogo de ácido siálico com o objetivo de

identificar o vírus influenza da gripe. O ácido siálico é um receptor específico para hemaglutinina do vírus da gripe. Os autores obtiveram sinais de transição colorimétrica em resposta à interação do vírus com grupos específicos na superfície do PDA, ou seja, o sensor mostrou ser capaz de detectar o vírus. Desde então, vários pesquisadores têm estudado o desenvolvimento de estruturas sensoras à base de PDA para detecção de diversas moléculas (CHEN et. al, 2012).

Existem diversos tipos de monômeros de diacetileno, e essa diversidade influencia nas estruturas sensoras formadas a partir de cada um deles. Charoenthai et al. (2011) avaliaram a resposta colorimétrica de vesículas de PDA com diferentes grupos cabeça e cadeias laterais frente a diferentes estímulos externos, incluindo temperatura, etanol e pH. Foram utilizados três monômeros diferentes para a síntese das vesículas, sendo eles o ácido 10,12-tricosadinóico (TCDA), ácido 10,12-pentacosadinóico (PCDA) e N-(2-aminoetil)-10,12-pentacosadinamida (AEPCDA) (Figura 5).

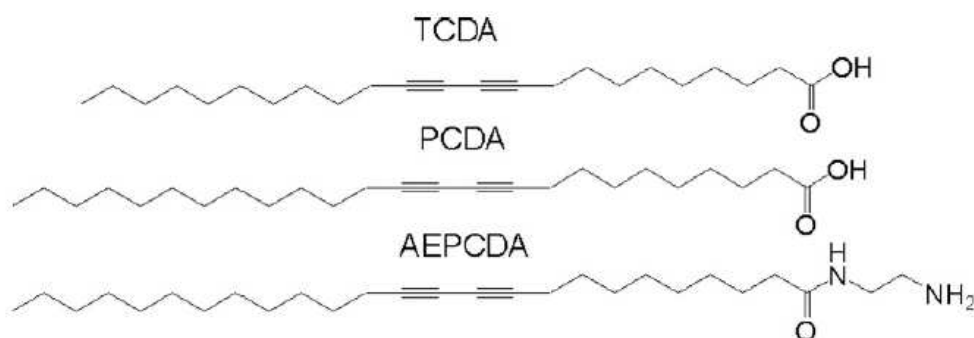


Figura 5: Estrutura química dos monômeros de diacetileno: ácido 10,12-tricosadinóico (TCDA), ácido 10,12-pentacosadinóico (PCDA) e N-(2-aminoetil)-10,12-pentacosadinamida (AEPCDA). (Fonte: CHAROENTHAI et al., 2011).

Os monômeros TCDA e PCDA possuem um mesmo grupo cabeça carboxílico, mas o comprimento da cadeia carbônica do TCDA é ligeiramente mais curto, e o AEPCDA possui grupos amina e amida. Os autores observaram que os comportamentos de transição de cor de vesículas de PDA dependem em grande parte de suas estruturas moleculares. Nas vesículas formadas por PCDA e TCDA, o encurtamento da cauda provocou uma resposta colorimétrica maior para todos os estímulos, isso foi atribuído às forças de interação inter e intramoleculares serem mais fracas dentro da bicamada vesicular. A modificação do grupo cabeça por meio da substituição do grupo carboxílico pelo grupo N-(2-aminoetilamida) (AEPCDA)

provocou uma pequena diminuição na temperatura de transição colorimétrica. A quantidade de etanol necessário para induzir a transição das vesículas de AEPCDA foi muito maior (87% v/v) quando comparada às demais vesículas, devido à resistência de sua camada de superfície, constituída de grupos amina e amida, à entrada do etanol para a bicamada de PDA. As vesículas com grupos cabeça carboxílicos (TCDA e PCDA) mudaram de cor com o aumento do pH, enquanto a redução do pH para 0 causou transição nas vesículas de AEPCDA.

A interface das estruturas formadas por PDA é carregada negativamente, (CHAROENTHAI et al., 2011) com isso, muitas aplicações na detecção de moléculas carregadas positivamente têm sido reportadas (SU et al., 2004). No entanto, a inclusão de unidades positivas na molécula de PDA pode conferir a capacidade de detecção de moléculas negativas também. Cho e Ahn (2013) utilizaram monômeros de diacetileno com monômeros de amina inseridos em sua cadeia carbônica para a síntese de vesículas sensoras, com o objetivo de detectar heparina, uma molécula biológica polianiônica. Os autores verificaram que a modificação da carga interfacial da vesícula sensora promoveu resposta colorimétrica. Este trabalho evidencia a importância das interações eletrostáticas para a detecção de moléculas pelos sensores de PDA.

Estudos mostram que é possível a incorporação de diversas moléculas nas estruturas sensoras de polidiacetileno. Essas moléculas podem atuar como elementos de reconhecimento de outras moléculas, contribuindo para a especificidade e sensibilidade do sensor e facilitando a identificação de compostos de interesse presentes em matrizes alimentícias, por exemplo. As moléculas receptoras podem ser carboidratos, enzimas, lipídeos, proteínas, anticorpos, entre outras. Além disso, sabe-se que a incorporação muitas vezes não afeta o processo de polimerização e as propriedades cromáticas dos agregados de PDA, e mantém, ainda, a eficiência biológica dos receptores incorporados no sistema (CHAROENTHAI et al., 2011; PAN e CHARYCH, 1997; SONG et al., 2002).

A introdução de lipídeos naturais, como esfingomielina, colesterol e fosfatidilcolina, na matriz de PDA pode melhorar a sua aplicabilidade para utilizações biológicas e de diagnóstico. Kim et al. (2008) incorporaram um fosfolípido (dimiristoilfosfatidilcolina, DMPC) em vesículas de PDA e observaram que em concentrações mais elevadas de DMPC resultou numa resposta colorimétrica

maior aos estímulos bacterianos. Os autores sugeriram que a incorporação de DMPC diminuiu a intensidade da ligação de hidrogênio entre os grupos amida e os ácidos carboxílicos das vesículas de polidiacetileno, o que resultou em uma estrutura menos rígida da cadeia principal de PDA.

Narkwiboonwong et al. (2011) desenvolveram nanoestruturas sensoras a partir de suspensões mistas de PDA + oligo(etilenoglicol) (EG) com o objetivo de detectar chumbo (Pb^{2+}). A presença de EG tornou a nanoestrutura de PDA mais flexível devido à diminuição das ligações de hidrogênio entre os grupos cabeça, o que foi evidenciado pela diminuição da temperatura de transição dos sensores. Os autores testaram a adição de outros metais como, $CdCl_2$, $Co(OAc)_2$, $Cu(OAc)_2$, $FeCl_2$, $HgCl_2$, $Ni(OAc)_2$, $Pb(NO_3)_2$ nos sensores, porém, nenhum deles apresentou RC superior a 15%. Assim, a incorporação de cadeias de EG nas estruturas de PDA foi eficaz para a construção de um sensor colorimétrico seletivo para Pb^{2+} em meio aquoso.

Nopwinyuwong et al. (2014) sintetizaram nanoestruturas de PDA/nanocompósitos de dióxido sílica (SiO_2) com o objetivo de desenvolver sensores de tempo/temperatura. Os surfactantes catiônicos poli (cloreto de dialildimetilamônio) (PDADMAC) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram adicionados para modificar a superfície dos nanocompósitos de sílica e promover atração eletrostática entre os PDAs aniônicos e seus grupos carregados. A transição colorimétrica das nanoestruturas de PDA puro, PDA / SiO_2 , PDA / SiO_2 / PDADMAC e PDA / SiO_2 / CTAB em diferentes temperaturas foi monitorada por um UV-vis continuamente por 48h. Com o aumento da temperatura, o espectro de absorção do PDA azul ($\lambda_{max} = \sim 640$ nm) diminuiu gradativamente, enquanto o espectro de absorção do PDA vermelho ($\lambda_{max} = \sim 540$ nm) aumentou ao longo do tempo de análise. A transição de cor das nanoestruturas foi irreversível e pôde ser observada visualmente. A RC de PDA / SiO_2 foi maior em comparação com as vesículas de PDA puros. Os resultados de RC para PDA / SiO_2 / surfactantes apresentaram as mesmas tendências que PDA / SiO_2 no entanto, os valores foram relativamente menores para cada temperatura. Além disso, a concentração de ambos os agentes tensoativos variou inversamente com a RC devido, provavelmente, ao efeito de impedimento estérico.

O diclorvos é um tipo de pesticida muito utilizado na agricultura potencialmente tóxico e contaminante de alimentos e água. Com o objetivo de detectar esse pesticida, Pimsen et al. (2014) desenvolveram um sensor colorimétrico baseado em PDA. O pesticida foi capaz de induzir transição colorimétrica nos sensores de PDA. O fosfolipídeo DMPC foi inserido na vesícula sensora e triplicou a sensibilidade de detecção visual do pesticida (150 ppb para 50 ppb). Utilizando um espectrofotômetro UV-vis o limite de detecção dos sensores foi de 6,7 ppb de pesticida em solução aquosa, além disso, o método apresentou seletividade ao pesticida em estudo.

Jiang et al. (2015) desenvolveram um biossensor a fim de detectar o vírus influenza H5. O biossensor foi sintetizado a partir da associação do monômero PCDA e do fosfolipídio DMPC. A fim de garantir a especificidade do biossensor, anticorpos do vírus influenza H5 foram incorporados na superfície da vesícula. A vesícula sensora foi capaz de detectar o vírus influenza H5 e diferenciá-lo de outros três vírus, mostrando uma intensa mudança colorimétrica de azul para vermelho perceptível visualmente. Os autores avaliaram 93 amostras por dois métodos tradicionais de detecção do vírus e pelo método do biossensor. O biossensor apresentou somente 2 resultados falsos positivos e foi considerado altamente sensível e específico, tornando-se um método promissor para diagnóstico de infecções por influenza H5.

A maioria dos trabalhos que exploram o potencial sensor dos PDAs utiliza as estruturas vesiculares (GOU et al., 2010; JANG et al., 2014; JIANG et al., 2015; LU et al., 2014; PIMSEN et al., 2014; SAMYNA et al., 2014; XIA et al., 2010). Apesar de essas estruturas apresentarem potencial de aplicação como sensores, existem alguns fatores limitantes para o seu emprego. Dentre esses fatores estão, a interação com diversos compostos além da molécula alvo, a necessidade de manutenção das vesículas em suspensão, homogeneidade insuficiente, falta de domínio de sua composição e organização e baixa estabilidade. Por isso, dispositivos e aplicações de biossensores reais empregando vesículas são raros (SCINDIA et al., 2007).

Segundo Kim et al. (2005), vesículas de PDA tendem a agregar em condições de temperatura ambiente por um período longo de tempo. Além disso, para algumas condições e moléculas, a resposta colorimétrica é limitada.

Diante das limitações do uso das vesículas como sensores, outras nanoestruturas vêm sendo desenvolvidas e propostas como sensores mais eficientes. Uma possibilidade são nanoblendas formadas por polidiacetileno e outro polímero na escala nanométrica.

Ortega (2012) propôs a síntese de nanoestruturas formadas por PDAs e copolímeros tribloco (CT) de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO). As transições eletrônicas das nanoestruturas foram estudadas em diferentes temperaturas e na presença de diferentes concentrações de NaOH e Na₂CO₃. As novas estruturas formadas chamadas de nanoblendas de PDA/CT foram mais sensíveis à temperatura e à presença dos eletrólitos em relação às vesículas de polidiacetileno convencionais. Os resultados mostraram ser possível modular a faixa de transição colorimétrica das nanoblendas, induzida pela temperatura, utilizando copolímeros de diferentes estruturas e concentrações na etapa de síntese.

Existem diversos tipos de copolímeros triblocos constituídos por diferentes proporções de cadeia hidrofílica e hidrofóbica. A diferença no balanço hidrofílico/hidrofóbico dos copolímeros triblocos pode levar a nanoblendas sensoras com características distintas (ORTEGA, 2012; SOUZA, 2014).

Copolímeros tribloco são moléculas obtidas pela junção de três segmentos poliméricos, sendo a parte central diferente dos dois segmentos externos, estes últimos iguais entre si. Dentre os diversos tipos de copolímeros tribloco existentes, têm-se os copolímeros tribloco Pluronic formados por óxido de etileno (EO) nas extremidades e óxido de propileno (PO) no centro. Estes polímeros são representados genericamente como PEO-PPO-PEO ou (EO)_n(PO)_m(EO)_n (Figura 6). Os índices “n” e “m” representa o número de monômeros de óxido de etileno e óxido de propileno, respectivamente (ALEXANDRIDIS e HATTON, 1995; SANAN e MAHAJAN, 2013).

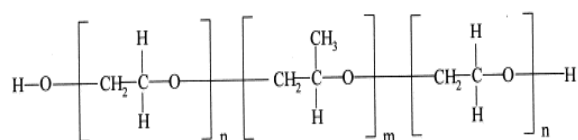


Figura 6: Fórmula genérica de copolímeros tribloco.

Um importante aspecto dos Pluronic é que seus diferentes blocos EO e PO apresentam hidrofilicidades diferentes. Os grupos EO são mais hidrofílicos e os grupos PO mais hidrofóbicos devido ao grupo metil extra na unidade PO. Esses

copolímeros do tipo tribloco fazem parte de uma categoria de material de grande aplicação tecnológica dada a sua capacidade de formar estruturas auto-organizadas. A presença desta diferença de hidrofobicidade entre os blocos dos copolímeros possibilita o fenômeno de micelização a partir de uma concentração micelar crítica (CMC). Algumas mudanças nas condições do meio aquoso, como temperatura, pH ou presença de sais, podem influenciar nesta propriedade (SANAN e MAHAJAN, 2013). A Figura 7 apresenta uma estrutura esquemática de um copolímero tribloco e de uma micela formada por esses copolímeros.



Figura 7: Representação esquemática de copolímero tribloco e uma micela.

As notações para os copolímeros Pluronic iniciam com a letra L, para líquidos, P para pastas ou F para flocos. Quanto aos números, o primeiro ou os dois primeiros dígitos indicam o peso molecular do bloco PPO, enquanto o último número indica a fração em peso dos blocos PEO. O L64 é um copolímero tribloco líquido com massa molar de 2900 g.mol^{-1} , CMC de 0,35% (m/m) à 25°C e fórmula estrutural $(\text{EO})_{13}(\text{PO})_{31}(\text{EO})_{13}$ (CAUSSE et al., 2010).

Castrillon (2013) observou que nanoblendas formadas de polidiacetileno e copolímero tribloco mostraram maior intensidade de coloração azul e maior estabilidade, comparadas às vesículas. A maior absorbância observada em 640 nm foi associada a um maior rendimento de polimerização dos monômeros de diacetileno quando estão presentes na estrutura da nanoblenda em relação à estrutura vesicular. O aumento da eficiência do processo de polimerização deve-se a um melhor empacotamento e orientação dos monômeros de diacetileno quando associados ao copolímero tribloco, uma vez que o aumento das regiões hidrofóbicas no sistema permite interações mais favoráveis para as caudas hidrofóbicas dos monômeros.

Souza (2014) utilizou nanoblendas de PDA/CT e detectou caseína micelar em quantidades muito pequenas, o que demonstra o potencial destas nanoestruturas para detectar e quantificar proteínas lácteas.

3.2 Albuminas do soro

Albuminas do soro são as proteínas solúveis mais abundantes no sistema circulatório, compreendendo 52-60% do plasma sanguíneo (BOURASSA et al., 2011; CARTER e HO, 1994; PETERS, 1996; SHUBHRAA et al., 2014; YANG et al., 2007).

Albuminas do soro possuem múltiplas funções biológicas e farmacocinéticas. Elas são capazes de se ligarem reversivelmente a uma grande variedade de ligantes endógenos e exógenos relativamente insolúveis. Diante disso, elas desempenham o papel principal no transporte sanguíneo de diversos metabólitos tais como, nutrientes, hormônios, vitaminas, aminoácidos, ácido graxo e uma variedade de fármacos. Além disso, esse grupo de proteínas atua na manutenção da pressão osmótica do sangue e na disposição de drogas, uma vez que aumenta a solubilidade de fármacos hidrofóbicos no plasma (ANAND e MUKHERJEE, 2013; BHATTACHARYA et al., 2000; BOURASSA et al., 2011; CARTER e HO, 1994; NAVEENRAJ e ANANDAN, 2013).

As albuminas do soro são proteínas formadas por uma sequência bem conhecida de, aproximadamente 580 aminoácidos que, sob condições fisiológicas, possuem estrutura tridimensional em forma de coração com três domínios homólogos I, II e III, sendo o primeiro hidrofílico e os demais, hidrofóbicos. Cada um desses três domínios contém 10 hélices e está subdividido em dois subdomínios (A e B) com hélices anti-paralelas ligadas por ligações dissulfeto (BOURASSA et al., 2011; HE e CARTER, 1992; PETERS, 1996) (Figura 8).

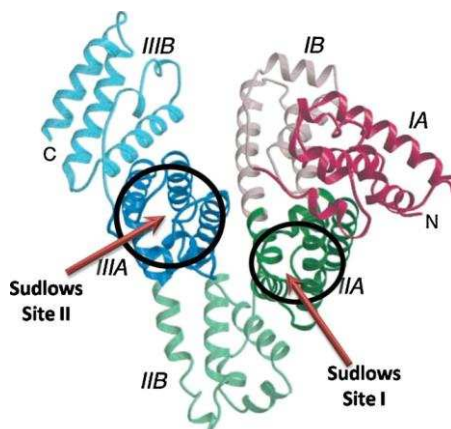


Figura 8: Estrutura tridimensional da albumina do soro humano (Fonte: CHUANG e OTAGIRI, 2006).

Existem dois principais locais de ligação presentes na albumina do soro localizados no subdomínio II A (sítio Sudlows I) e III A (sítio Sudlows II). O sítio I é considerado mais amplo enquanto, o sítio II é menor. O sítio II apresenta menor flexibilidade em relação ao sítio I e, muitas vezes, as interações intermoleculares nesse sítio são afetadas fortemente pela estereoseletividade. Em relação às interações que ocorrem em cada sítio, o sítio I interage principalmente por meio de interações hidrofóbicas, já o sítio II envolve uma combinação de ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas e eletrostáticas (CHUANG e OTAGIRI, 2006; ERCELEN et al., 2005).

Dentre as albuminas do soro, a albumina do soro bovino (BSA) e a albumina do soro humano (HSA) são as mais estudadas. A BSA exibe cerca de 80% de homologia sequencial com a HSA (BABU et al., 2014; SUGIO et al., 1999).

A BSA é uma proteína globular e apresenta massa molar de 66,4 kDa e corresponde a cerca de 1,5% da proteína total do leite e 8% da fração de proteínas do soro de leite (INDYK et al., 2015). A BSA é constituída por uma sequência conhecida de 583 resíduos de aminoácidos incluindo 17 ligações dissulfetos intramoleculares e um grupo tiol livre. O ponto isoelétrico da BSA é em pH de aproximadamente 4,6 e, em pH neutro, possui uma carga superficial de -17 e um diâmetro de 5-7 nm (INDYK et al., 2015; KUN et al., 2009).

A HSA é uma proteína globular com massa molar de 66,5 kDa com uma sequência de 585 aminoácidos e, assim como a BSA, possui 17 ligações dissulfetos intramoleculares e um grupo tiol livre. Em pH neutro, a HSA possui carga líquida de -15 e ponto isoelétrico aproximadamente em pH 5,0. Apesar de ambas as proteínas apresentarem resíduos de aminoácidos carregados e regiões apolares cobrindo suas interfaces, o interior das proteínas é praticamente de natureza hidrofóbica (GEKLE, 2005; HAN et al., 2012; MEMARPOOR-YAZDI e MAHAKI, 2013; PETERS, 1996).

Uma diferença fundamental entre a BSA e a HSA é que, a primeira contém dois resíduos do aminoácido triptofano (Trp 212 e Trp 134), enquanto a HSA tem apenas um (Trp 214). O Trp 134 está localizado na interface da BSA no primeiro domínio, ou seja, em uma região hidrofílica da molécula. O Trp 212 da BSA e Trp 214 da HSA estão localizados em ambientes semelhantes, ambos se encontram no interior hidrofóbico de suas estruturas biopoliméricas no segundo domínio. A Figura

9 mostra a estrutura tridimensional de HSA e BSA com a localização dos resíduos de triptofano (ANAND et al., 2010; BOURASSA et al., 2011; DE et al., 2013; TAYEH et al., 2009).

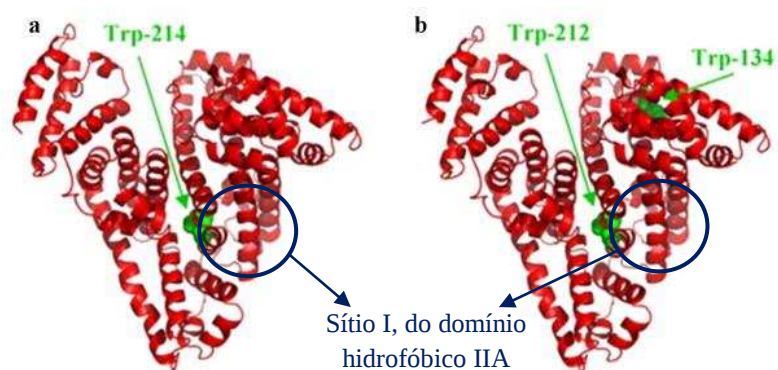


Figura 9: Estrutura tridimensional de albuminas do soro: (a) HSA e (b) BSA, com resíduos de triptofano mostrados na cor verde, localizados no sítio I do domínio hidrofóbico IIA das proteínas (Adaptado de BOURASSA et al., 2011).

Tendo em vista que a interação de várias moléculas com as albuminas do soro ocorre nos diferentes sítios da proteína, alterações na conformação do biopolímero podem ser estudadas por meio da avaliação do efeito da presença de ligantes na fluorescência intrínseca das proteínas (LAKOWICZ, 2006; SULKOWSKA, 2002).

As albuminas séricas possuem fluorescência intrínseca emitida em 340 nm quando excitadas a 280 e 295 nm. No comprimento de onda de excitação de 280 nm a fluorescência é proveniente de três aminoácidos aromáticos presentes na cadeia proteica, Trp, tirosina (Try) e fenilalanina (Phe) enquanto, à 295nm somente o Trp é responsável pela fluorescência emitida. Geralmente, a fluorescência intrínseca de albuminas do soro é decorrente essencialmente pelo resíduo de Trp (CROUSE et al., 2012; LAKOWICZ, 2006; MEMARPOOR-YAZDI e MAHAKI, 2013; SULKOWSKA, 2002).

Uma característica muito importante da fluorescência intrínseca das albuminas do soro é a elevada sensibilidade às mudanças que envolvem a região onde se encontram os fluoróforos. Alterações como transição conformacional, interação intermolecular, associação de subdomínios e exposição a solventes são capazes de influenciar o espectro de emissão de fluorescência (LAKOWICZ, 2006, MEMARPOOR-YAZDI e MAHAKI, 2013). No caso específico da BSA, interações que ocorrem na interface (domínio hidrofílico I) e, ou no interior hidrofóbico (sítio I, do sub-domínio IIA) irão alterar a fluorescência emitida pela proteína.

Diante disso, o estudo da interação dessas albuminas do soro com diferentes moléculas ligantes tem atraído interesse de muitos pesquisadores. Surfactantes, fármacos, polímeros, lipídios, vesículas e nanomateriais, são exemplos dessas moléculas.

3.3 Técnicas experimentais para o estudo de interação entre a BSA e nanoblendas polidiacetilênicas

Sensores de polidiacetileno são classificados como sensores colorimétricos em razão da alteração espectrofotométrica que ocorre na presença de moléculas de interesse. Na presença de determinados estímulos esses polímeros são capazes de mudar da cor azul para vermelho. Diante disso, a quantificação da extensão desta alteração colorimétrica é muito útil para determinar a sensibilidade e especificidade desses sensores. A resposta colorimétrica (RC) é um parâmetro que tem sido amplamente utilizado para mensurar a porcentagem de moléculas de polidiacetileno que sofreu transição espectrofotométrica em decorrência de algum estímulo. A RC é calculada por meio da obtenção do espectro eletrônico da suspensão polidiacetilênica na ausência e na presença da molécula de interesse (Figura 2), obtido por meio da técnica de espectrofotometria de UV-vis.

A partir dos valores de absorvância obtidos nos comprimentos de onda de aproximadamente 640 e 540 nm, referentes às colorações observadas visualmente como azul e vermelha, respectivamente, é possível calcular a RC, conforme proposto por Charych et al. (1993) (Equação 1).

$$RC = \left(\frac{\left(\frac{A_{\text{azul}}}{A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}}} \right)_i - \left(\frac{A_{\text{azul}}}{A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}}} \right)_f}{\left(\frac{A_{\text{azul}}}{A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}}} \right)_i} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Na equação, “A” é a absorvância para o componente azul (~640 nm) e para o componente vermelho (~540 nm) obtidos em um espectro de UV-visível. Os termos “azul” e “vermelho” referem-se à aparência do material e os índices “i” e “f” são referentes às absorvâncias antes e após a adição do estímulo que provoca a alteração espectrofotométrica, respectivamente.

A transição colorimétrica do polidiacetileno após a exposição à determinada molécula, proteínas, por exemplo, indica que houve interação entre eles e quanto

maior for o valor de RC, mais moléculas de polidiacetileno converteram da forma azul para a forma vermelha. No entanto, apesar da RC ser um parâmetro importante, apenas a obtenção do seu valor não é suficiente para definir os mecanismos de interação entre diferentes moléculas e o sensor polidiacetilênico. Para isso, outras técnicas mais sensíveis e específicas precisam ser realizadas.

Atualmente, diversas técnicas têm sido empregadas para caracterizar possíveis interações intermoleculares em diferentes sistemas. Em se tratando de interações envolvendo proteínas, técnicas como microcalorimetria de titulação isotérmica, nanocalorimetria diferencial de varredura, espectroscopia de fluorescência, e técnicas eletrocinéticas merecem destaque, pois permitem a determinação de parâmetros termodinâmicos de interação intermolecular (variação de entalpia, da entropia e da energia livre de Gibbs de interação, variação da entalpia de transição conformacional, constante de interação, diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta) que são essenciais para a compreensão dos mecanismos de interação entre polidiacetilenos e diferentes proteínas.

Desde que uma das moléculas alvo no estudo de interação intermolecular possua fluoróforos, a espectroscopia de fluorescência é uma técnica muito útil para investigar estas interações no estado fundamental. O aminoácido triptofano (Trp), por exemplo, emite fluorescência na faixa entre 300 e 500 nm, quando excitado a 295 nm. Portanto, interações intermoleculares que ocorrem entre proteínas e outras moléculas podem ser estudadas por meio da espectroscopia de fluorescência (CROUSE et al., 2012).

A fluorescência é um processo de fotoluminescência no qual os átomos ou moléculas são excitados por absorção de radiação eletromagnética. Assim, ao retornarem ao estado fundamental, ocorre a liberação de energia através da emissão de um fóton (fluorescência) a uma taxa de radiação constante. Esse fenômeno é muito rápido, ocorre em uma faixa de 10^{-8} s a 10^{-9} s (LAKOWICZ, 2006).

A obtenção de espectros de emissão de fluorescência de uma espécie química é possível em um espectrofluorímetro (Figura 10) onde são definidas as condições de análise como, comprimento de onda de excitação, faixa de comprimento de onda de emissão, larguras de fendas de excitação e emissão, dentre outras.

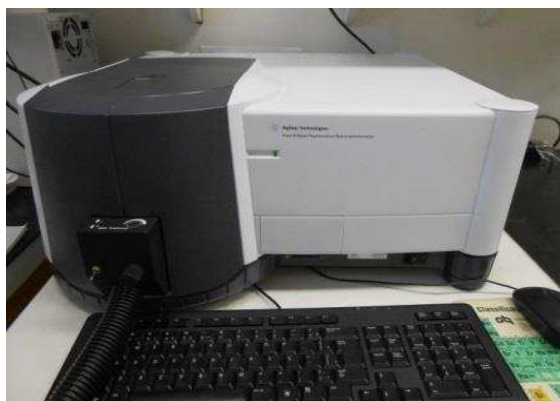


Figura 10: Espectrofluorímetro (CaryEclipse Fluorescence Spectrometer - Agilent).

A fluorescência do triptofano é muito sensível a mudanças no meio. Assim, alterações nos espectros de emissão do Trp são comuns diante de diversos fatores, como, transição conformacional e rotacional da proteína e ligação com diversas moléculas (LAKOWICZ, 2006). Além disso, a técnica apresenta como principal vantagem, a alta sensibilidade a mudanças no ambiente e na estrutura das proteínas. Dessa forma, a interação de diferentes moléculas diretamente com o triptofano ou em regiões próximas ao triptofano irá promover alterações no espectro de fluorescência de proteínas que contenham este aminoácido. As proteínas BSA e HSA (Figura 9) possuem Trp em suas estruturas e, por isso o uso da técnica de fluorescência no estudo de interações que envolvem essas proteínas é extremamente útil (GAO et al., 2005).

A supressão ou extinção da fluorescência intrínseca da proteína pode contribuir para o entendimento dos mecanismos de interação entre proteínas e outras moléculas, como a constante de ligação, o número de sítios de ligação e as distâncias intermoleculares (LAKOWICZ, 2006; NANDA et al., 2007; SHI et al., 2012). O mecanismo de supressão varia com o par fluoróforo-supressor podendo ocorrer por diversos mecanismos, principalmente por supressão dinâmica ou supressão estática. A supressão dinâmica ocorre quando os fluoróforos no estado excitado colidem com moléculas (chamadas de quencher, supressor ou ligante) e transferem a energia absorvida dos fótons para elas, retornando ao estado fundamental, sem emitir fluorescência. Neste caso, não existe formação de complexos entre as moléculas que interagiram. Por outro lado, a supressão estática ocorre quando o fluoróforo forma um complexo com o supressor no estado fundamental. Assim, quando este complexo

absorve luz, ele retorna imediatamente ao estado fundamental sem emissão de fóton (BO et al., 2007; MANDAL et al., 2013).

A redução na intensidade de fluorescência é descrita pela Equação 2 de Stern-Volmer (GHARAGOZLOU e BOGHAEI, 2008; MANDAL et al., 2013).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad \text{Equação 2}$$

Na equação, K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer, F_0 e F correspondem às intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença do supressor, respectivamente, $[Q]$ é a concentração do agente de extinção da fluorescência, k_q é a constante de taxa de supressão e τ_0 é o tempo de meia-vida da biomolécula na ausência do supressor (cerca de 10^{-8} s para proteínas). A relação entre F_0/F e $[Q]$ é linear e, K_{SV} é a inclinação da reta obtida. K_{SV} está relacionada com o tempo de meia-vida do fluoróforo e o valor de k_q pode ser usado para determinar o tipo de supressão. Para supressão dinâmica, o valor máximo da constante de taxa de supressão é de $2,0 \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Valores superiores a esse sugerem que a natureza da supressão é estática, indicando a formação de complexos (BO et al., 2007; CROUSE et al., 2012; CROUSE et al., 2011; GHARAGOZLOU e BOGHAEI, 2008; MANDAL et al., 2013).

Se o mecanismo de supressão da fluorescência é considerado estático, há indício de formação de complexo entre o fluoróforo (por exemplo, a proteína) e o ligante. Neste caso, a constante de ligação (K_a) e o número de sítios de ligação por molécula (n) podem ser calculados usando a Equação 3 (BARDAJEE et al., 2013; NAIK et al., 2010).

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_a + n \log [Q] \quad \text{Equação 3}$$

A obtenção de K_a é importante pois possui relação direta com a variação da energia livre de Gibbs padrão de formação do complexo (ΔG°) (Equação 4). A obtenção de um valor negativo para este parâmetro termodinâmico indica que a formação do complexo é favorecida em relação aos reagentes.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad \text{Equação 4}$$

A determinação de K_a em diferentes temperaturas permite a obtenção da variação da entalpia padrão de formação do complexo (ΔH°), por meio da aproximação de van't Hoff (Equação 5).

$$\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad \text{Equação 5}$$

O valor de ΔG° possui uma contribuição entálpica e outra entrópica. A obtenção dessas componentes fornece informações sobre as forças motrizes para a formação do complexo. Uma vez que os parâmetros ΔG° e ΔH° foram calculados, a equação fundamental de Gibbs (Equação 6) permite a obtenção do termo entrópico.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Equação 6}$$

Diversos autores têm utilizado a espectroscopia de fluorescência para estudar a interação intermolecular entre BSA e diferentes moléculas (BASU e KUMAR, 2015; BATTAL et al., 2009; FORNAGUERA et al., 2015; JHA e KISHORE, 2011; KUMARAN e RAMAMURTHY, 2014; MANDAL et al., 2013; SU et al., 2011; WU et al, 2015), inclusive com polímeros e outras nanoestruturas.

A interação com moléculas capazes de extinguir a fluorescência intrínseca das albuminas do soro pode causar, ou não, um deslocamento no pico do espectro de emissão máxima. Se a molécula que interage extingue a fluorescência sem afetar o máximo espectral, a hidrofobicidade e polaridade da região onde se encontra o fluoróforo não são alteradas. Por exemplo, as nanopartículas de ouro extinguem a fluorescência de albuminas do soro (NAVEENRAJ et al., 2010) sem causar qualquer efeito sobre o espectro de fluorescência máxima (Figura 11 (a)). Por outro lado, se a molécula supressora provoca um deslocamento no máximo espectral, indica que houve uma variação da polaridade e hidrofobicidade da região próxima ao fluoróforo (KRAGH-HANSEN et al., 2001). Por exemplo, a fluorescência de BSA extinta por nanopartículas de prata (Figura 11 (b)) é acompanhado por um deslocamento no máximo de emissão de BSA (MARIAM et al., 2011).

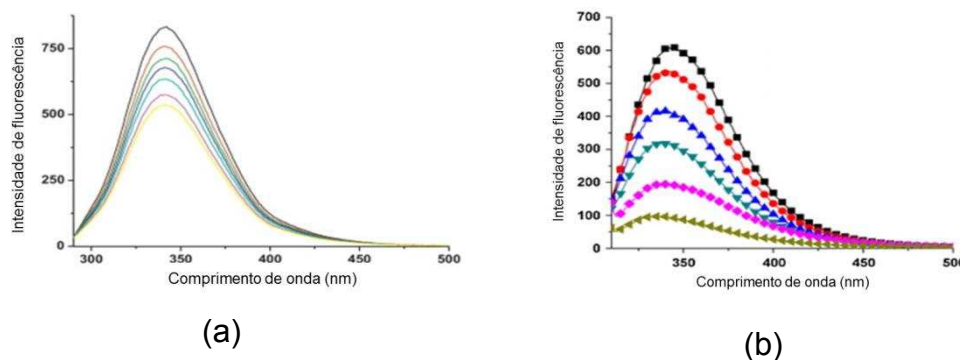


Figura 11: Espectros de emissão de fluorescência: (a) espectros de fluorescência da BSA extinta por nanopartículas de ouro (Fonte: NAVEENRAJ et al., 2010); (b) espectros de fluorescência de BSA e BSA na presença de concentrações crescentes de nanopartículas de prata (Fonte: MARIAM et al., 2011).

Battal et al. (2009) estudaram a interação entre BSA e um polieletrólito aniônico (ácido poliacrílico - PAA) por meio de técnicas de fluorescência, turbidimetria e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O estudo revelou que houve vários tipos de formação de complexos dependentes da carga superficial da proteína e do polieletrólito, da proporção BSA/PAA e dos valores de pH. A formação desses complexos causou mudanças nos espectros de emissão de fluorescência da BSA. A intensidade de fluorescência da BSA diminuiu acentuadamente quando diferentes concentrações de PAA foram adicionadas e, houve deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão. As proporções de BSA/PAA e o pH da solução influenciaram na intensidade das interações e na solubilidade dos complexos. A interação em $\text{pH} > \text{pI}$ ($\text{pH} 6,0 - 7,0$) foi fraca e, em $\text{pH} = 5,0$ houve formação de complexos solúveis em água e estáveis em uma ampla faixa de proporções de BSA/PAA (0,1; 0,25; 0,4; 0,5; 0,75; 1,0). A existência de complexos de PAA-BSA solúveis e insolúveis foram observadas em $\text{pH} < \text{pI}$ ($\text{pH} 4,0 - 4,3$). Os autores sugeriram que a repulsão eletrostática entre a proteína carregada negativamente e o polieletrólito aniônico, em $\text{pH} = 7,0$, impediu a formação de complexos estáveis em todas as proporções estudadas.

Anand et al. (2010) estudaram a interação da HSA com o surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) utilizando os métodos de fluorescência e espectroscopia de dicroísmo circular e modelagem matemática. A ligação de SDS no domínio II da HSA, que aloja o único resíduo de aminoácido triptofano (Trp214), foi monitorada, e verificou-se que a adição do surfactante ocorre de maneira sequencial, dependendo da razão molar proteína: surfactante (Figura 12). A intensidade de

fluorescência da HSA diminuiu com o aumento da concentração de SDS, ou seja, as moléculas do agente tensoativo desempenharam o papel de supressor da fluorescência do Trp 214. A espectroscopia de dicroísmo circular confirmou mudanças estruturais induzidas por SDS. Gráficos de Stern-Volmer e os parâmetros termodinâmicos foram utilizados para caracterizar a ligação sequencial de SDS com HSA. Segundo os autores, estes parâmetros não só confirmaram que a ligação foi de natureza espontânea, mas também foi bastante forte, dependendo da concentração do agente tensoativo adicionado.

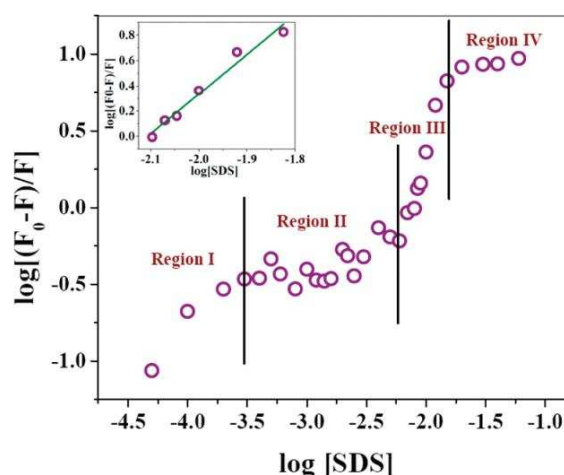


Figura 12: Gráfico de Stern-Volmer. F_0 e F são as intensidades do pico de fluorescência da HSA na ausência e na presença de SDS, respectivamente. As regiões (I-IV) representam as várias fases de ligação de SDS com HSA.

A nanocalorimetria diferencial de varredura (nano-DSC, do inglês differential scanning nanocalorimetric) é uma técnica muito utilizada em estudos de transições ou processos que são induzidos pela alteração da temperatura. O nanocalorímetro diferencial de varredura (Figura 13) é capaz de determinar a estabilidade térmica e o calor específico de macromoléculas em soluções diluídas com precisão da ordem de nanojoules (MURCIANO-CALLES et al., 2010).



Figura 13: Nanocalorímetro diferencial de varredura (Nano DSC 6300-A - TA instruments, USA).

Parâmetros termodinâmicos são obtidos a partir dos termogramas (Figura 14) de um nano-DSC. A temperatura correspondente ao máximo da curva de calor específico versus temperatura define a temperatura média de transição (T_m), e a integração do pico obtido fornece diretamente a variação da entalpia de transição, ΔH_{des} (Equação 7).

$$\Delta H_{des} = \int_{T_i}^{T_f} Cp^0 dT \quad \text{Equação 7}$$

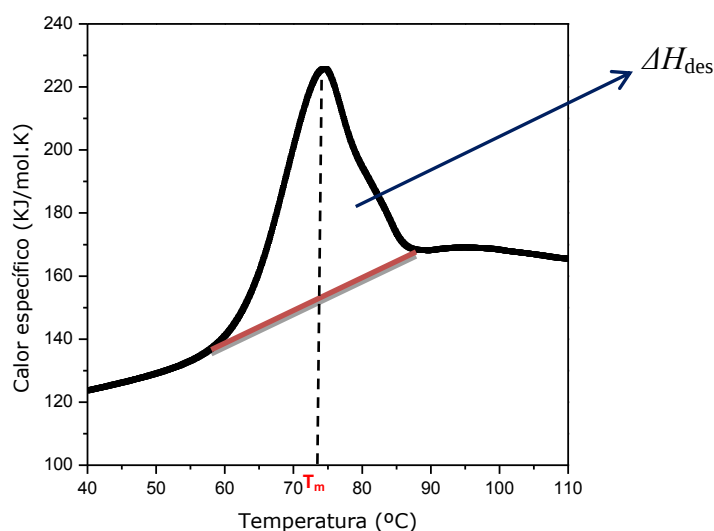


Figura 14: Termograma da BSA em solução aquosa obtido a partir de um nano-DSC.

Por meio da técnica de nano-DSC é possível avaliar mudanças conformacionais de biomoléculas promovidas pela interação com diferentes ligantes, proporcionando uma medida direta da variação de entalpia devido a transições

térmicas que ocorrem em macromoléculas. Para análise de proteínas, por exemplo, é avaliada a variação da entalpia de alteração conformacional ou desnaturação (ΔH_{des}) de uma proteína nativa, que ocorre a uma temperatura média de desnaturação (T_m) e que reflete a energia de estabilização da proteína. Quando uma molécula ligante interage com uma proteína, pode haver um aumento na energia de interação, aumentando assim a estabilidade da proteína. Logo, a T_m aumenta proporcionalmente com a energia de interação entre o ligante e a proteína (BASU e KUMAR, 2015; KAMAL et al., 2010).

A termodinâmica da interação entre tartarazina e albuminas do soro (BSA e HSA) foi investigada por Basu e Kumar (2015) por meio das técnicas de IT μ C e nano-DSC. As constantes de ligação calculadas a partir dos dados de IT μ C revelaram que a tartrazina teve uma maior afinidade de ligação com a BSA do que com a HSA. O processo termodinâmico de interação com ambas as albuminas do soro foi exotérmico, impulsionado por uma grande contribuição entálpica negativa. Os estudos de nano-DSC revelaram que as temperaturas de fusão (T_f) da BSA e HSA, na ausência do corante, foram 327,61 e 328,85 K, respectivamente. Na presença de tartrazina as T_f da BSA e HSA foram aumentadas para 331,84 e 336,07 K, respectivamente. Esse aumento das T_f indicou que a complexação com tartrazina aumenta a estabilidade termodinâmica de ambas às proteínas. Além disso, foi observado que não houve mudança significativa na forma dos termogramas obtidos após a complexação com tartrazina, sugerindo que a interação com o corante não alterou o processo de desnaturação, mas apenas deslocou para temperaturas mais elevadas.

As propriedades térmicas dos monômeros de diacetileno TCDA, PCDA e AEPCDA foram estudadas por Charoenthai et al. (2011) por meio da técnica de nano-DSC. A temperatura de fusão (T_f) de cada monômero foi obtida no pico máximo dos respectivos termogramas. TCDA e PCDA possuem o mesmo grupo cabeça carboxílicos, porém o TCDA possui 2 carbonos a menos em sua cadeia carbônica em relação ao PCDA. Os monômeros TCDA e PCDA exibiram T_f de 56,3 °C e 62,8 °C, e variação de entalpia de fusão ($\Delta_f H$) de 53,6 kJ/mol e 57,9 kJ/mol, respectivamente. A T_f menor do TCDA indicou que a energia entálpica necessária para romper a estrutura do TCDA foi menor em relação ao PCDA. O aumento dos valores de T_f e $\Delta_f H$ do PCDA foi atribuído à maior intensidade das

interações intermoleculares devido à sua cauda hidrofóbica maior, visto que os dois monômeros apresentam o mesmo grupo cabeça. O monômero AEPCDA possui uma cadeia carbônica semelhante ao PCDA, enquanto o grupo cabeça é constituído por grupos amina e amida. O termograma do AEPCDA apresentou picos endotérmicos em 57,00; 65,00 e 101,00 °C, ou seja, a mudança do grupo cabeça provocou uma considerável alteração no comportamento de fusão do monômero. A soma dos valores de ΔH_f das três transições foi menor em relação ao PCDA. A formação de duas ligações de hidrogênio entre os grupos cabeça do AEPCDA provocou aumento da rigidez molecular, no entanto, a presença de várias regiões de transição não permitiu uma comparação direta entre as intensidades de interação intermolecular dos monômeros AEPCDA e PCDA. Os autores sugerem que a diferença estrutural entre os monômeros de diacetileno influenciou na intensidade das interações intermoleculares e, conseqüentemente, refletirá nas interações na bicamada de suas respectivas vesículas.

Partículas dispersas em água ou solução aquosa podem adquirir carga elétrica na sua superfície devido a fatores como, adsorção específica de íons ou ionização dos grupos superficiais, dependendo do pH do meio. A presença ou ausência de carga em partículas coloidais é de extrema importância porque pode influenciar na estabilidade do sistema e, ou nas interações intermoleculares com diferentes moléculas (ATTARD et al., 2000; HEURTAULT et al., 2003).

O desenvolvimento dessa carga superficial das partículas afeta a distribuição de íons na região interfacial circundante, resultando em um aumento na concentração de contra íons próximos à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. A dupla camada elétrica é constituída por duas regiões: uma mais interna chamada de camada de Stern, onde os íons estão fortemente ligados, e outra mais externa denominada de camada difusa (ou camada de Goy-Chapman) que se distribui em torno da primeira (HEURTAULT, et al. 2003). A distribuição de íons na camada difusa é determinada pelo equilíbrio de forças elétricas e movimento térmico aleatório. Dessa forma, o potencial nessa região diminui à medida que se distancia da superfície da partícula, até atingir o potencial da solução, que é convencionado como potencial zero. Ao se aplicar um campo elétrico a uma dispersão coloidal, cada partícula e os íons mais fortemente ligados (camada de Stern) se movem como uma unidade, e o potencial no plano de

cisalhamento, entre essa unidade e o meio circundante, é chamado de potencial zeta ou potencial eletrocinético (ATTARD, et al.2000; MORRISON e ROSS, 2002).

Na dupla camada elétrica o único potencial que pode ser determinado experimentalmente é o potencial zeta (Equação 8). Para isso, a dispersão é colocada em uma célula de eletroforese e submetida a um campo elétrico. Partículas carregadas migram para o eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional ao potencial zeta, essa velocidade é denominada mobilidade eletroforética, permitindo assim o cálculo do potencial zeta. Dessa forma, pode-se dizer que o potencial zeta é um importante parâmetro físico-químico utilizado para estimar a carga presente em superfícies de partículas coloidais indicando assim, a estabilidade desses sistemas e possíveis interações de partículas com outras moléculas no meio (ATTARD, et al.2000; HEURTAULT, et al. 2003).

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(\kappa R)}{3\eta} \quad \text{Equação 8}$$

Na equação, U_E é a mobilidade eletroforética ($\mu\text{m.cm/V.s}$), ε é a constante dielétrica, ζ é o potencial zeta (mV), $f(\kappa R)$ a função de Henry e η a viscosidade do solvente (cP). Em relação à função de Henry, se o potencial zeta for medido em sistemas aquosos, adota-se $f(\kappa R) = 1,5$ e, para sistemas não aquosos o valor utilizado é $f(\kappa R) = 1,0$ (DOUGHERTY et al., 2008).

O tamanho das partículas coloidais pode ser alterado em razão das interações intermoleculares, devido a mecanismos de agregação destas partículas, como por exemplo, a coalescência. A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês dynamic light scattering) baseia-se na determinação das flutuações na intensidade da luz espalhada pelas partículas, em função do tempo. Uma grande vantagem desta técnica sobre o espalhamento de luz estático é permitir a determinação da distribuição do diâmetro das partículas, e não apenas um valor médio de diâmetro. Outra vantagem importante é a possibilidade da obtenção de informações sobre a composição superficial das partículas, considerando que o método é sensível ao diâmetro hidrodinâmico efetivo, isto é, o raio da partícula somado ao raio da camada de solvatação. O princípio da técnica é as partículas estão em movimento aleatório constante, movimento browniano, difusa a uma velocidade relacionada com o seu

tamanho, sendo que, partículas menores possuem difusão mais rápida em relação às partículas maiores (PECORA, 1985; SCHARTL, 2007).

Por meio da medida da mobilidade eletroforética e do espalhamento dinâmico de luz, o equipamento zetasizer (Figura 15) é capaz de medir o potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico, respectivamente, de moléculas em suspensões aquosas.

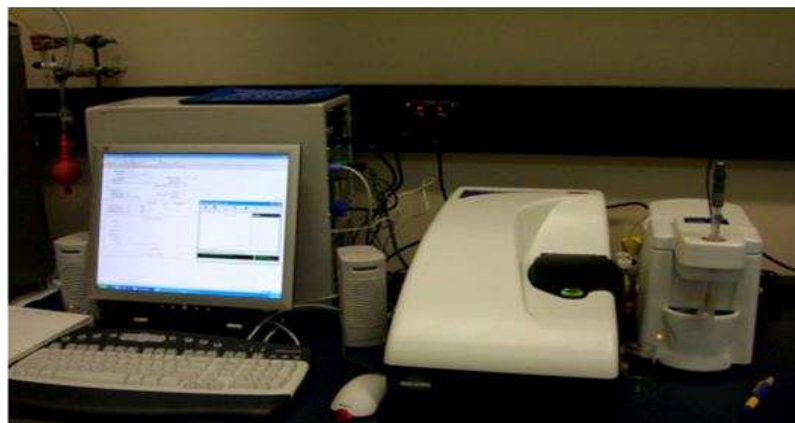


Figura 15: Zetasizer (Nano ZS90 - Malvern).

Trabalho realizado por Souza (2014) teve como objetivo determinar as forças motrizes envolvidas na interação intermolecular entre caseína micelar e nanoblendas de PCDA/CT. O potencial zeta e tamanho foram medidos para avaliar o efeito dessa interação na estrutura e superfície das nanoblendas. Ambos os parâmetros aumentaram a medida que aumentava a concentração de caseína micelar adicionada. Esse resultado demonstrou que as interações entre o sensor e a proteína ocorrem predominantemente na região superficial das nanoestruturas.

Shubhra et al. (2014) modificaram a superfície de um fármaco hidrofóbico para reduzir a adsorção de proteínas de transporte visando prolongar o tempo de sua permanência na corrente sanguínea. O copolímero tribloco Pluronic F68 (F68) foi utilizado nesse estudo para modificar a superfície de nanopartículas de poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) magnetita (PLGA) (NPs) que continha HSA como fármaco modelo. Técnicas de espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta e calorimetria de titulação isotérmica foram utilizadas para caracterizar as superfícies das NPs tratadas e não tratadas com F68 e investigar a adsorção da proteína BSA. O F68 foi capaz de se ligar à superfície das NPs de PLGA uma vez que, a adição do copolímero provocou aumento no tamanho e no potencial zeta das NPs. O aumento das cargas negativas superficiais contribuiu para a estabilidade cinética das suspensões de NPs. O aumento do tamanho e diminuição do potencial zeta das NPs

não tratadas após a adsorção de BSA (157 nm e -36 mV para 183 nm e -24 mV) foram muito superiores quando comparados às alterações provocadas nas NPs tratadas com F68 (172 nm e -42 mV para 180 nm e -34 mV), ou seja, uma menor quantidade de proteína foi adsorvida em NPs tratadas.

A adsorção de BSA na superfície das NPs (não tratada e tratada) foi espontânea, uma vez que a variação da energia livre de Gibbs de adsorção (ΔG) foi negativa. Para NPs não tratadas, a variação da entalpia de adsorção (ΔH) foi menor em relação às tratadas e a variação de entropia (ΔS) foi positiva, indicando que o processo foi conduzido entropicamente envolvendo interações principalmente hidrofóbicas. Para as NPs tratadas houve aumento no valor de ΔH e ΔS foi negativo indicando que o processo foi entálpicamente dirigido envolvendo ligações de hidrogênio, entre BSA e F68, além de interações hidrofóbicas, entre BSA e PLGA. Os resultados mostraram que a modificação da superfície de NPs de PLGA com F68 foi eficaz e reduziu a adsorção de proteínas contribuindo para a manutenção prolongada das NPs carregadas de HSA na corrente sanguínea.

A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) é um parâmetro termodinâmico extremamente importante que diz respeito à espontaneidade de determinado processo termodinâmico. O ΔG° possui duas componentes, uma entálpica e outra entrópica e, a determinação dessas componentes permite elucidar as forças motrizes que regem o processo termodinâmico de interação entre nanoblenda e proteína, por exemplo. Com a utilização de um microcalorímetro de titulação isotérmica é possível obter essas componentes.

A energia liberada ou absorvida na forma de calor em um processo termodinâmico pode ser medida por meio de equipamentos e técnicas calorimétricas que permitam a sua detecção. Com o desenvolvimento de microcalorímetros cada vez mais sensíveis, a microcalorimetria de titulação isotérmica (IT μ C, do inglês isothermal titration microcalorimetry) tem sido largamente aplicada na determinação de vários processos moleculares e considerada como a técnica mais apropriada para tal fim (BASU e KUMAR, 2015; LOF et al., 2007; LOH e BRINATTI, 2011).

Em um microcalorímetro de titulação isotérmica, os processos termodinâmicos que ocorrem no sistema são avaliados em condições de temperatura e pressão constantes. Desta forma, de acordo com a equação que expressa a primeira lei da termodinâmica (Equação 9):

$$dU = dq + dW \quad \text{Equação 9}$$

Na equação, U é a energia interna do sistema, q é a energia trocada entre sistema e vizinhança na forma de calor (J) e w é a energia trocada entre sistema e vizinhança na forma de trabalho ($\text{Pa}\cdot\text{m}^3$). Considerando que o processo sob análise ocorre entre um estado inicial i e um estado final f e que o sistema está restrito apenas à realização de trabalho de expansão ou compressão. Integrando a Equação 9 e considerando que $U + PV$ é entalpia (H) (P é a pressão e V o volume do sistema):

$$\begin{aligned} \int_i^f dU &= \int_i^f dq - \int_i^f PdV \\ U_f - U_i &= q - P(V_f - V_i) \\ (U_f + PV_f) - (U_i + PV_i) &= q \\ \Delta H &= H_f - H_i = q \end{aligned} \quad \text{Equação 10}$$

Dessa forma, a variação de entalpia é numericamente igual à quantidade de energia transferida na forma de calor entre sistema e vizinhança sob estas condições (Equação 10). Diante disso, é possível determinar a variação de entalpia que ocorre em um sistema como resultado de algum processo termodinâmico utilizando um calorímetro.

A partir de uma única titulação, pode-se determinar de forma simultânea as variações de entalpia de interação ($\Delta_{\text{int}}H$) e a constante de ligação (K_a). A partir do valor de K_a é possível determinar as mudanças na variação da energia livre de Gibbs padrão de formação de complexo (ΔG°) e, posteriormente a variação de entropia padrão de formação de complexo (ΔS°), de acordo com as Equações 4 e 6, respectivamente (WADSÖ, 2001; SILVA, et al. 2006; LOH and BRINATTI, 2011).

O microcalorímetro de titulação isotérmico (Figura 16) é um instrumento termodinâmico capaz de registrar fenômenos termodinâmicos que liberam ou absorvem energia por unidade de tempo na ordem de microwatts de potência em condições essencialmente isotérmicas. A titulação microcalorimétrica isotérmica permite detectar fluxos de energia da ordem de 10^{-9} J que ocorrem em um determinado processo (WADSÖ, 2001; LOH e BRINATTI, 2011).

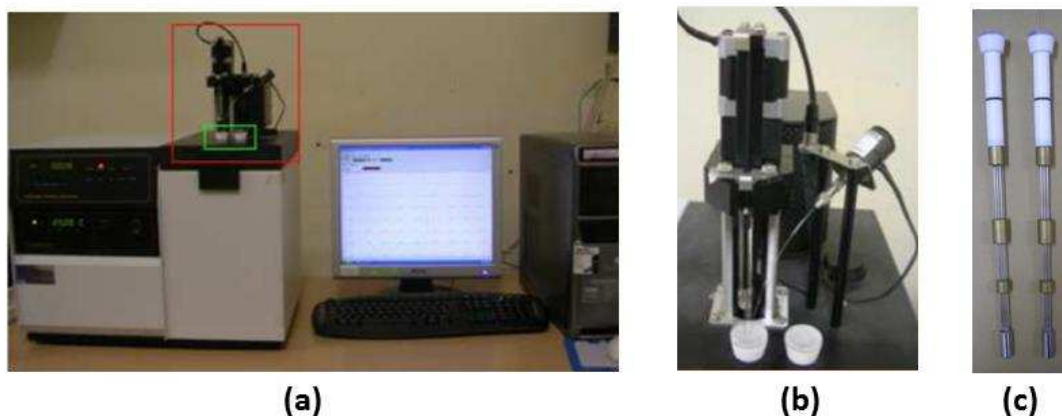


Figura 16: Microcalorímetro de titulação isotérmico (CSC 4200 - Calorimeter Science Corporation) (a), sistema de injeção composto por uma micro seringa ligada a torre de amostra e um motor de agitação (b), detalhes das duas celas de aço inoxidável, de amostra e referência, que se encontram no final das torres (c).

O equipamento possui duas torres e, ao final delas se encontram as celas de amostra e a cela de referência. Em se tratando do experimento de interação entre proteína e nanoblendas, por exemplo, a solução proteica é titulada por meio de uma micro seringa de alta precisão na cela de amostra que contém a nanoblenda. A cela de referência também contém nanoblenda, no entanto, nada é titulado nela durante a análise. As injeções consecutivas são controladas por um motor de passo sendo que, a adição é automática e o intervalo no tempo entre uma adição e outra é constante, controlado por um software. A homogeneização da amostra é realizada por um agitador (300 rpm) que gira no interior da célula de amostra.

Durante as injeções ocorre uma mudança no fluxo de energia na cela de amostra em relação à cela de referência em razão da adição da proteína. Os dispositivos termoeletrônicos, chamados de termopilhas, são capazes de medir as variações de energia, liberada ou absorvida, na forma de calor entre as duas celas. O sinal gerado é plotado em um gráfico de potência versus tempo, sendo que cada injeção corresponderá a um pico. O final da titulação é percebido quando os picos começam a ficar constantes, indicando que está ocorrendo variação de energia devido à diluição apenas.

Os valores da energia liberada ou absorvida na forma de calor são obtidos pela integração das deflexões ocorridas a partir da linha base (ΔH_1). Uma vez que, a quantidade de moléculas de proteína adicionada durante a titulação é conhecida (n_{ptm}) é possível calcular a variação de entalpia molar a partir da Equação 11:

$$\Delta_{Obs}H = \frac{\Delta H_1}{n_{ptn}} \quad \text{Equação 11}$$

A fim de eliminar o efeito da diluição, é necessário fazer outra titulação. Dessa vez, a solução proteica será titulada na cela de amostra que conterá o solvente utilizado na preparação das amostras, no nosso caso, solução do copolímero. A partir desse experimento calcula-se o $\Delta_{dil}H$ referente à variação de entalpia devido à diluição apenas (Equação 12)

$$\Delta_{dil}H = \frac{\Delta H_2}{n_{ptn}} \quad \text{Equação 12}$$

Não é possível afirmar que todas as moléculas de proteína titulada durante o experimento interagiu com as moléculas da nanoblenda, impossibilitando o cálculo exato da variação de entalpia de interação. No entanto, a diferença entre $\Delta_{Obs}H$ e $\Delta_{dil}H$ fornece a variação de entalpia aparente de interação ($\Delta_{ap-int}H$) (Equação 13).

$$\Delta_{ap-int}H = \Delta_{Obs}H - \Delta_{dil}H \quad \text{Equação 13}$$

Pires et al. (2010a) estudaram a termodinâmica de interação entre vesículas de PDA e diferentes solventes. O trabalho apresentou pela primeira vez medidas de energia envolvida no processo de solvatocromismo. Foram avaliadas vesículas de PDA e PDA + esfingomielina (ES) + colesterol (CO) adicionadas dos solventes tetracloreto de carbono (CCl_4), clorofórmio ($CHCl_3$) e diclorometano (CH_2Cl_2). Todos os solventes foram capazes de causar transição colorimétrica em ambas vesículas. Pela técnica microcalorimétrica, os autores observaram uma mudança de entalpia associada com o processo de transição colorimétrica e com energia de interação entre as moléculas de solvente e as vesículas. Os resultados obtidos por IT μ C indicaram que apenas o $CHCl_3$ induz uma transição colorimétrica entálpicamente dirigida, enquanto os solventes CH_2Cl_2 ou CCl_4 causaram uma transição de cor entropicamente regida.

Mandal et al. (2013) estudaram a interação entre nanopartículas de carbono (NPCs) e albuminas do soro, BSA e HSA. Espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular e nanocalorimetria de titulação isotérmica foram as técnicas utilizadas para o estudo da interação. A presença de NPCs causou

uma notável supressão da fluorescência intrínseca de ambas as proteínas. As constantes de supressão de fluorescência e constantes de taxa de supressão foram $K_{SV} = 8,87 \times 10^6$ e $1,23 \times 10^7 \text{ lit.M}^{-1}$; $k_q = 8,87 \times 10^{14}$ e $1,23 \times 10^{15} \text{ lit.M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para BSA e HSA, respectivamente, indicando uma forte supressão estática com formação de complexo entre as NPCs e as proteínas.

As análises de ITμC revelaram que as interações entre as moléculas em estudo foram exotérmicas e favorecidas pelas variações entálpicas e entrópicas ($\Delta H^0 = -1548$ e -670 ; $T\Delta S^0 = -1537,98$ e $-659,77$, para BSA e HSA, respectivamente). As constantes de ligação K_a obtidas a partir dos dados de ITμC para NPCs e BSA, e NPCs e HSA foram $1,92 \times 10^7$ e $2,07 \times 10^7$, respectivamente. Os espectros de dicroísmo circular mostraram alterações significativas e desdobramento parcial da estrutura secundária das proteínas. Assim, os autores sugeriram que a interação com NPCs pode influenciar nas propriedades de transporte e nas diferentes funções biológicas das albuminas do soro.

Jha e Kishore (2011) avaliaram a termodinâmica de interação entre ácido fólico e BSA por meio das técnicas de nanocalorimetria de titulação isotérmica e espectroscopia de fluorescência e de dicroísmo circular. Titulações calorimétricas em diferentes temperaturas e na presença de cossolutos possibilitou uma análise detalhada da natureza das forças moleculares que participaram da interação. A interação foi considerada um processo exotérmico em que o aumento da temperatura conduziu a uma diminuição na constante de ligação ($K_a = 7,19 \times 10^3$ (288,15 K) para $3,07 \times 10^3$ (308,15 K)). Foi observado que o aumento da força iônica provocou redução de K_a de $5,31 \times 10^3$ para $2,62 \times 10^3$ (NaCl $0,02 \text{ mol.dm}^{-3}$) sugerindo predominância de interações eletrostáticas, uma vez que, em concentração de NaCl igual a $0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$ não foi observada ligação, ΔH próximo de 0. A contribuição de interações hidrofóbicas foi evidenciada pela diminuição de K_a na presença do tensoativo brometo de tetrabutilamônio sugerindo que os cátions do tensoativo competiram com o ácido fólico pelo sítio hidrofóbico carregado negativamente da BSA. O valor de K_a na presença de sacarose indicou que ligações de hidrogênio também desempenharam uma contribuição significativa ($K_a = 5,31 \times 10^3$ para $1,46 \times 10^3$).

A adição de ácido fólico foi capaz de reduzir a intensidade de fluorescência intrínseca da BSA. O valor de k_q para BSA e ácido fólico ($10^{13} \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) indicou

que houve supressão estática com formação de complexo. A espectroscopia de dicroísmo circular não indicou mudanças conformacionais significativas na proteína após a interação com o ácido fólico.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH A.A.; ABDEL-REHIM F.; SOLIMAN Y.S. A new label dosimetry system based on pentacosadiynoic acid monomer for low dose applications. **Radiat Phys Chem.**, v.81, p. 70-76, 2012.

AHN, D.J.; LEE, S.; KIM, J.M. Rational design of conjugated polymer supramolecules with tunable colorimetric responses. **Adv. Funct. Mater.**, v.19, p. 1483–1496, 2009.

ALEXANDRIDIS, P., HATTON, T. A., Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. **Colloid Surface A**, v.96, p. 1-46, 1995.

ANAND, U.; MUKHERJEE, S. Binding unfolding and refolding dynamics of serum albumins. **Biochim Biophys Acta**, v.1830, p. 5394–5404, 2013.

ANAND, U.; JASH, C.; MUKHERJEE, S. Spectroscopic Probing of the Microenvironment in a Protein–Surfactant Assembly. **J. Phys. Chem. B**, v.114, p. 15839–15845, 2010.

ATTARD, P.; ANTELM, D.; LARSON, I. Comparison of the zeta potential with the diffuse layer potential from charge titration. **Langmuir**, v.16, p. 1542–1552, 2000.

BABU, E.; MAREESWARAN, P.M.; SINGARAVADIVEL, S.; BHUVANESWARI, J.; RAJAGOPAL S. A selective, long-lived deep-red emissive ruthenium (II) polypyridine complexes for the detection of BSA. **Spectrochim Acta A**, v.130, p. 553–560, 2014.

BARDAJEE G.R.; HOOSHYAR, Z.; KHANJARI, M. Dye fluorescence quenching by newly synthesized silver nanoparticles. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, v.276, p. 113–121, 2013.

BASU, A.; KUMAR, G.S. Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins: A microcalorimetric investigation. **Food Chem**, v.175, p. 137–142, 2015.

BATTAL, Y.B.; TOPUZOGULLARI, M.; MUSTAFAEVA, Z. The Fluorescence Study of Interaction Between Bovine Serum Albumin and Polyacrylic Acid. **J Fluoresc**, 2009.

BHATTACHARYA, A.A.; CURRY, S.; FRANKS, N.P. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures. **J. Biol. Chem.**, v.275, p. 38731–38738, 2000.

BO, X.J.; WEN, C.J.; HUI, C.; LIAN, R.F.; SHENG, Y.C.; YUE, C.; MING, X. Study of the interaction between baicalin and bovine serum albumin by

multispectroscopic method. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, v.191, p. 222–227, 2007.

BOURASSA, P.; HASNI, I.; TAJMIR-RIABI, H.A. Folic acid complexes with human and bovine serum albumins. **Food Chem**, v.129, p. 1148–1155, 2011.

CARPICK, R.W.; SASAKI, D.Y.; MARCUS, M.S.; ERIKSSON, M.A.; BURNS, A.R. Polydiacetylene films: a review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. **J. Phys.: Condens. Matter**, v.16, p. 679–697, 2004.

CARTER, D.C.; HO, J.X. Structure of serum albumin. **Adv. Protein Chem.**, v.45, p. 153–203, 1994.

CASTRILLON, E.D.C. **Nanosensores ópticos de polidiacetileno para el reconocimiento de moléculas de interés ambiental y alimenticio**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

CAUSSE J., OBERDISSE J., JESTIN J., LAGERGE S. Small-Angle Neutron Scattering Study of Solubilization of Tributyl Phosphate in Aqueous Solutions of L64 Pluronic Triblock Copolymers. **Langmuir**, v.26, p. 15745–15753, 2010.

CHAROENTHAI, N.; PATTANATORNCHAI, T.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M.; TRAIPHOL, R. Roles of head group architecture and side chain length on colorimetric response of polydiacetylene vesicles to temperature, ethanol and pH. **J. Colloid Interface Sci.**, v.360, p. 565–573, 2011.

CHARYCH D.H.; NAGY J.O.; SPEVAK W.; BEDNARSKI M.D. Direct colorimetric detection of a receptor-ligand interaction by a polymerized bilayer assembly. **Science**, v.261, p. 585–588, 1993.

CHEN, X., ZHOU, G.; PENG, X.; YOON, J. Biosensors and chemosensors based on the optical responses of polydiacetylenes. **Chem. Soc. Rev.**, v.41, p. 4610–4630, 2012.

CHENG Q.; YAMAMOTO M.; STEVENS R.C. Amino acid terminated polydiacetylene lipid microstructures: morphology and chromatic transition. **Langmuir**, v.16, p. 5333–5342, 2000.

CHO, Y.S.; AHN, K.H. Molecular interactions between charged macromolecules: colorimetric detection and quantification of heparin with a polydiacetylene liposome. **J. Mater. Chem. B**, v.1, p. 1182–1189, 2013.

CHUANG, V.T.G.; OTAGIRI, M. Stereoselective binding of human serum albumin. **Chirality**, v.18, p. 159–166, 2006.

CROUSE, H.F.; PETRUNAK, E.M.; DONOVAN, A.M.; MERKLE, A.C.; SWARTZ, B.L.; BASU, S. Static and dynamic quenching of tryptophan fluorescence in various proteins by a chromium (III) complex. **Spectrosc. Lett.**, v.44, p. 369–374, 2011.

CROUSE, H.F.; POTOMA, J.; NEJRABI, F.; SNYDER, D.L.; CHOCHAN, B.S.; BASU S. Quenching of tryptophan fluorescence in various proteins by a series of small nickel complexes. **Dalton Trans.**, v.41, p. 2720–2731, 2012.

DE, D.; KAUR, H.; DATTA, A. Unusual binding of a potential biomarker with human serum albumin. **Chem. Asian J.**, v.8, p. 728–735, 2013.

DOUGHERTY, G.M.; ROSE, K.A.; TOK, J.B.H.; PANNU, S.S.; CHUANG, F.Y.S.; SHA, M.Y.; CHAKAROVA, G.; PENN, S.G. The zeta potential of surface-functionalized metallic nanorod particles in aqueous solution. **Electrophoresis**, v.29, p. 1131-1139, 2008.

ERCELEN, S.; KLYMCHENKO, A.S.; MÉLY, Y.; DEMCHENKO, A.P. The binding of novel two-color fluorescence probe FA to serum albumins of different species. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.35, p. 231-242, 2005.

FORNAGUERA, C.; CALDERÓ, G.; SOLANS, C.; VAUTHIER, C. Protein–nanoparticle interactions evaluation by immunomethods: Surfactants can disturb quantitative determinations. **Eur J Pharm Biopharm**, v.94, p. 284–290, 2015.

GAO, D.; TIAN, Y.; BI, S.; CHEN, Y.; YU, A.; ZHANG, H. Studies on the interaction of colloidal gold and serum albumins by spectral methods. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v.62, p. 1203–1208, 2005.

GEKLE, M. Renal tubule albumin transport. **Annu. Rev. Physiol.**, v.67, p. 573–594, 2005.

GHARAGOZLOU, M.; BOGHAEI, D.M. Interaction of water-soluble amino acid Schiff base complexes with bovine serum albumin: fluorescence and circular dichroism studies. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v.71, p. 1617–1622, 2008.

GOU, M.; GUO, G.; ZHANG, J.; MEN, K.; SONG, J.; LUO, F.; ZHAO, X.; QIAN, Z.Y.; WEI, Y.Q. Time–temperature chromatic sensor based on polydiacetylene (PDA) vesicle and amphiphilic copolymer. **Sensor Actuat B-Chem**, v.150, p. 406–411, 2010.

GUO, J.; YANG, L.; ZHU, L.; CHEN, D. Selective detection of metal ions based on nanocrystalline ionochromic polydiacetylene. **Polymer**, v.54, p. 743–749, 2013.

HAN, X.L.; TIAN, F.F.; GE, Y.S.; JIANG, F.L.; LAI, L.; LI, D.W.; YU, Q.L.; WANG, J.; LIN, C.; LIU, Y. Spectroscopic, structural and thermodynamic properties of chlorpyrifos bound to serum albumin: A comparative study between BSA and HSA. **J Photoch Photobio B**, v.109, p. 1–11, 2012.

HE, X.M.; CARTER, D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin, **Nature**, v.358, p. 209–215, 1992.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.-E.; BENOIT, J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v.24, p. 4283–4300, 2003.

INDYK, H.E.; GILL, B.D.; WOOLLARD, D.C. An optical biosensor-based immunoassay for the determination of bovine serum albumin in milk and milk products, **Int Dairy J**, v.47, p. 72-78, 2015.

JANG, H.; JUNG, S.; SHIN, K.S.; KIM, S.M.; JEON, T.J. Polydiacetylene (PDA) Vesicle Based Colorimetric Biosensor for Detection of Genetically Modified (GM) Crops. **Biophys J**, v.106, p. 417, 2014.

JELINEK, R.; RITENBERG, M. Polydiacetylenes – recent molecular advances and applications. **RSC Adv.**, v.3, p. 21192–21201, 2013.

JHA, N.S.; KISHORE, N. Thermodynamic studies on the interaction of folic acid with bovine serum albumin. **J. Chem. Thermodynamics**, v.43, p. 814–821, 2011.

JIANG, H.; WANG, Y.; YE, Q.; ZOU, G.; SU, W.; ZHANG, Q. Polydiacetylene-based colorimetric sensor microarray for volatile organic compounds. **Sensor Actuat B**, v.143, p. 789–794, 2010.

JIANG, L.; LUO, J.; DONG, W.; WANG, C.; JIN, W.; XIA, Y.; WANG, H.; DING, H.; JIANG, L.; HE, H. Development and evaluation of a polydiacetylene based biosensor for the detection of H5 influenza virus. **J Virol Methods**, v.219, p. 38–45, 2015.

JUNG, Y.K.; PARK, H.G. Colorimetric detection of clinical DNA samples using an intercalator-conjugated polydiacetylene sensor. **Biosens Bioelectron**, v.72, p. 127–132, 2015.

KAMAL, M.Z.; AHMAD, S.; YEDAVALLI, P.; RAO, N.M. Stability curves of laboratory evolved thermostable mutants of a *Bacillus subtilis* lipase. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1804, p. 1850–1856, 2010.

KIM, J. M.; LEE, J. S.; CHOI, H.; SOHN, D.; AHN, D. J. Rational design and in-situ FTIR analyses of colorimetrically reversible polydiacetylene supramolecules. **Macromolecules**, v.38, p. 9366-9376, 2005.

KIM, J.M.; JI, E.K.; WOO, S.M.; LEE, H.; AHN, D.J. Immobilized polydiacetylene vesicles on solid substrates for use as chemosensors. **Adv. Mater**, v.15, p.1118-1121, 2003.

KIM, K-W.; CHOI, H.; LEE, G.S.; AHN, D.J.; OH, M-K. Effect of phospholipid insertion on arrayed polydiacetylene biosensors. **Colloid Surface B**, v.66, p. 213–217, 2008.

KRAGH-HANSEN, U.; HELLEC, F.; FORESTA, B.; MAIRE, M.L.; MØLLER, J.V. Detergents as probes of hydrophobic binding cavities in serum albumin and other water-soluble proteins. **Biophys. J.**, v.80, p. 2898-2911, 2001.

KUMARAN, R.; RAMAMURTHY, P. Photophysical studies on the interaction of amides with Bovine Serum Albumin (BSA) in aqueous solution: Fluorescence quenching and protein unfolding. **J. Lumin.**, v.148, p. 277–284, 2014.

KUN, R.; SZEKERES, M.; DÉKÁNY I. Isothermal titration calorimetric studies of the pH induced conformational changes of bovine serum albumin. **J Therm Anal Calorim.**, v. 96, p. 1009–1017, 2009.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3ed, Kluwer Academic, New York, 2006.

LOF, D.; NIEMIEC, A.; SCHILLEN, K.; LOH, W.; OLOFSSON, G. A calorimetry and light scattering study of the formation and shape transition of mixed micelles of EO₂₀PO₆₈EO₂₀ triblock copolymer (P123) and nonionic surfactant (C₁₂EO₆). **J. Phys. Chem. B**, v.111, p. 5911-5920, 2007.

LOH, W.; BRINATTI, C. Calorimetry is not color-blind. Molecular insights on association processes in surfactant-polymer mixtures derived from calorimetric experiments. **Sci. China Chem.**, v.54, p. 2024-2027, 2011.

LU, S.; JIA, C.; DUAN, X.; ZHANG, X.; LUO, F.; HAN, Y.; HUANG, H. Polydiacetylene vesicles for hydrogen peroxide detection. **Colloids and Surfaces A**, v.443, p. 488– 491, 2014.

MANDAL, S.; HOSSAIN, M.; DEVI, P.S.; KUMAR, G.S.; CHAUDHURIA, K. Interaction of carbon nanoparticles to serum albumin: elucidation of the extent of perturbation of serum albumin conformations and thermodynamical parameters. **J Hazard Mater**, v. 248, p. 238– 245, 2013.

MARIAM, J.; DONGRE, P.M.; KOTHARI, D.C. Study of interaction of silver nanoparticles with bovine serum albumin using fluorescence spectroscopy. **J. Fluoresc.**, v.21, p. 2193-2199, 2011.

MEMARPOOR-YAZDI, M.; MAHAKI, H. Probing the interaction of human serum albumin with vitamin B2 (riboflavin) and L-Arginine (L-Arg) using multi-spectroscopic, molecular modeling and zeta potential techniques. **J. Lumin.**, v.136, p.150–159, 2013.

MORRISON, I. D.; ROSS, S. **Colloidal dispersions: suspensions, emulsions and foams**. New York: Wiley-InterScience, 2002.

MURCIANO-CALLES, J.; COBOS, E.S.; MATEO, P.L.; CAMARA-ARTIGAS, A.; MARTINEZ, J.C. An Oligomeric Equilibrium Intermediate as the Precursory Nucleus of Globular and Fibrillar Supramacromolecular Assemblies in a PDZ Domain. **Biophys. J.**, v. 99, p. 263–272, 2010.

NAIK, A.B.; NAIK, L.R.; KADADEVARMATH, J.S.; PAL, H.; RAO, V.J. Fluorescence quenching of anthrylvinyl acetate by carbon tetrachloride. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, v. 214, p. 145–151, 2010.

NALLICHERI R.A.; RUBNER M.F. Investigations of the mechanochromic behavior of poly(urethane-diacetylene) segmented copolymers. **Macromolecules**, v.24, p. 517-525, 1991.

NANDA, R.K.; SARKAR, N.; BANERJEE, R.J. Probing the interaction of ellagic acid with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. **Photochem. Photobiol. A**, v. 192, p. 152-158, 2007.

NARKWIBOONWONG, P.; TUMCHARERN, G.; POTISATITYWENYONG, A.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M. Aqueous sols of oligo(ethylene glycol) surface decorated polydiacetylene vesicles for colorimetric detection of Pb²⁺. **Talanta**, v. 83, p. 872–878, 2011.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C**, v.14, p. 53– 71, 2013.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S.; KATHIRAVAN, A.; RENGANATHAN, R.; ASHOKKUMAR, M. The interaction of sonochemically synthesized gold nanoparticles with serum albumins. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.53, p. 804 –810, 2010.

NOPWINYUWONG, A.; KITAOKA, T.; BOONSUPTHIP, W.; PECHYEN, C.; SUPPAKUL, P. Effect of cationic surfactants on characteristics and colorimetric behavior of polydiacetylene/silica nanocomposite as time–temperature indicator. **Appl Surf Sci**, v.314, p. 426–432, 2014.

OKADA, S.; PENG, S.; SPEVAK, W.; CHARYCH, D.H. Color and chromism of polydiacetylene vesicles. **Acc. Chem. Res.**, v.31, p. 229-239, 1998.

ORTEGA, P. F. R. **Novas nanoestruturas de polidiacetileno: Fundamentos e aplicações**. 2013. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

PAN, J.; CHARYCH, D. Molecular Recognition and Colorimetric Detection of Cholera Toxin by Poly(diacetylene) Liposomes Incorporating GM1 Ganglioside. **Langmuir**, v.13, p. 1365-1367, 1997.

PECORA, R. **Dynamic Light Scattering-Applications of Photon Correlation Spectroscopy**. Plenum Press, New York, London, 420 p., 1985.

PETERS, T.J. **All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications**, Academic Press, 1996.

PIMSEN, R.; KHUMSRI, A.; WACHARASINDHU, S.; TUMCHARERN, G.; SUKWATTANASINITT, M. Colorimetric detection of dichlorvos using polydiacetylene vesicles with acetylcholinesterase and cationic surfactants. **Biosens Bioelectron**, v.62, p. 8–12, 2014.

PIRES, A.C.S.; SOARES, N.F.F.; da SILVA, L.H.M.; da SILVA, M.C.H.; MAGESTE, A.B.; SOARES, R.F.; TEIXEIRA, A.V.N.C.; ANDRADE, N.J. Thermodynamic study of colorimetric transitions in polydiacetylene vesicles induced by the solvent effect. **J. Phys. Chem. B**, v.114, p. 13365–13371, 2010a.

PIRES, A.C.S.; SOARES, N.F.F.; da SILVA, L.H.M.; da SILVA; ALMEIDA, M.V.; LE HYARIC, M.; SOARES, R.F.; MAGESTE, A.B.; REIS; S.G. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria. **Sens. Actuators, B**, v.153, p. 17–23, 2011.

PIRES, A.C.S.; SOARES, N.F.F.; SILVA, L.H.M.; ANDRADE, N.J.; SILVEIRA, M.F.A.; CARVALHO, A.F. Polydiacetylene as a biosensor: Fundamentals and applications in the food industry. **Food Bioprocess Tech.**, v.3, p. 172-181, 2010b.

SAMYNA, P.; SHROFF, K.; PRUCKER, O.; RUHE, J.; BIESALSKI, M. Fluorescent sensibility of microarrays through functionalized adhesive polydiacetylene vesicles. **Sensors and Actuators A: Phys**, v.214, p. 45–57, 2014.

SANAN, R.; MAHAJAN, R.K. Polyethylene glycol assisted micellar, interfacial and phase separation studies of triblock copolymer–nonionic surfactant mixtures. **Colloids and Surfaces A**, v.433, p. 145–153, 2013.

SCHARTL, W. **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions**. Springer, Berlin, 191 p., 2007.

SCINDIA, Y.; SILBERT, L.; VOLINSKY, R.; KOLUSHEVA, S.; JELINEK, R. Colorimetric detection and fingerprinting of bacteria by glass-supported lipid/polydiacetylene films. **Langmuir**, v.23, p. 4682-4687, 2007.

SHI, S.; ZHANG, Y.; XIONG, X.; HUANG, K. L.; CHEN, X. Q.; PENG, M. J. The influence of flavonoids on the binding of pantoprazole to bovine serum albumin by spectroscopic methods: With the viewpoint of food/drug interference. **Food Chem.**, v.135, p. 1083–1090, 2012.

SHIN, M.J.; BYUN, D.H.; KIM, J.D. Sensitivity limitation of the sensor fabricated with polydiacetylene. **J. Ind. Eng. Chem.**, v.23, p. 279–284, 2015.

SHUBHRAA, Q.T.H.; TÓTHB, J.; GYENISB, J.; FECZKÓ, T. Surface modification of HSA containing magnetic PLGA nanoparticles by poloxamer to decrease plasma protein adsorption. **Colloids and Surfaces B**, v.122, p. 529–536, 2014.

SILVA, L.H.M.; SILVA, M.C.H.; AQUINO, R.A.N.; FRANCISCO, K.R.; CARDOSO, M.V.C.; MINIM, L.A. Nitroprusside- PEO enthalpic interaction as a driving force for partitioning of the $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]_2^-$ anion in aqueous two-phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts. **J. Phys. Chem. B**, v.110, p. 23540–23546, 2006.

SONG, J.; CHENG, Q.; ZHU, S.; STEVES, R.C. “Smart” materials for biosensing devices: cell-mimicking supramolecular assemblies and colorimetric detection of pathogen agents. **Biomed. Microdevices**, v.3, p. 213-221, 2002.

SOUZA, L.C. **Interação entre caseína micelar e nanoblendas de polidiacetileno/copolímeros triblocos (EO)_n-(PO)_m-(EO)_n**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2014.

SU, Y.L.; LI, J.R.; JIANG, L. Effect of amphiphilic molecules upon chromatic transitions of polydiacetylene vesicles in aqueous solutions. **Colloid Surface B**, v.39, p. 113-118, 2004.

SU, Z.; ZHANG, L.; ZHAO, J.; CHEN, X. Investigation of the complexation of proteins with neutral water soluble polymers through model analysis method. **Polymer**, v.52, p. 1084-1091, 2011.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Eng.**, v. 12, p. 439–446, 1999.

SULKOWSKA, A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. **J. Mol. Struct.**, v.614, p. 227-232, 2002.

SUN, X.; CHEN, T.; HUANG, S.; Li, L.; PENG, H. Chromatic polydiacetylene with novel sensitivity. **Chem. Soc. Rev.**, v.39, p. 4244-4257, 2010.

TAYEH, N.; RUNGASSAMY, T.; ALBANI, J. R. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. **J. Pharmaceut Biomed**, v.50, p. 107–116, 2009.

van den HEUVEL M.; LOWIK D.; van HEST J.C.M. Self-assembly and polymerization of diacetylene-containing peptide amphiphiles in aqueous solution. **Biomacromolecules**, v.11, p. 1676-1683, 2010.

WACHARASINDHU, S.; MONTHA, S.; BOONYISENG, J.; POTISATITYUENYONG, A.; PHOLLOOKIN, C.; TUMCHARERN, G.; SUKWATTANASINITT M. Tuning of thermochromic properties of polydiacetylene toward universal temperature sensing materials through amido hydrogen bonding **J. Macromolecules**, v.43, p. 716–724, 2010.

WADSÖ, I. Isothermal microcalorimetry: current problems and prospects. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v.64, p. 75–84, 2001.

WANG X.Y.; WHITTEN J.E.; SANDMAN D.J. Ultraviolet photoelectron spectroscopy studies of the thermochromic phase transition in urethane-substituted polydiacetylenes. **J Chem Phys.**, v.126, p. 184905-184911, 2007.

WANG, M.; WANG, F.; WANG, Y.; ZHANG, W.; XIAOQIANG CHEN, X. Polydiacetylene-based sensor for highly sensitive and selective Pb²⁺ detection. **Dyes Pigments**, v.120, p. 307–313, 2015.

WU, D.; YAN, J.; WANG, J.; WANG, Q.; LI, H. Characterisation of interaction between food colourant allura red AC and human serum albumin: Multispectroscopic analyses and docking simulations. **Food Chem**, v.170, p. 423–429, 2015.

XIA, Y.; DENG, J.; JIANG, L. Simple and highly sensitive detection of hepatotoxin microcystin-LR via colorimetric variation based on polydiacetylene vesicles. **Sensors and Actuators B: Chem**, v.145, p. 713–719, 2010.

YANG, F.; BIAN, C.; ZHU, L.; ZHAO, G.; HUANG, Z.; HUANG, M. Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. **J. Struct. Biol.**, v.157, p. 348–355, 2007.

POLYDIACETYLENE/TRIBLOCK COPOLYMER NANOSENSOR FOR THE DETECTION OF NATIVE AND FREE BOVINE SERUM ALBUMIN

Abstract

Bovine serum albumin (BSA) detection is very important in the food, pharmaceutical and medical industries. However, traditional techniques used to detect BSA are often time-consuming, expensive, and show limited sensitivity. This paper describes the sensor properties of polydiacetylene-triblock copolymer nanoblends, synthesized to easily detect small amounts of BSA. The nanosensor efficiency was studied as a function of nanoblend composition (with or without cholesterol), polydiacetylene chemical structures, BSA conformation, and BSA hydrophobic domain availability using spectroscopic, calorimetric, light scattering, and electrokinetic analyses. Polydiacetylene-copolymer (L64) nanoblends detected small concentration of BSA (0.04 mM) and could discriminate between native and denatured protein at room temperature through naked-eye detectable blue-to-red transition. The standard Gibbs free energy ($-10.44 < \Delta G^\circ < -49.52$ kJ M), stoichiometry complex ($1 < "n" < 3$), and binding constant ($6.7 \times 10^2 < K_a < 4.79 \times 10^8$ M⁻¹) of BSA-nanoblend complex formation allowed us to establish a direct relationship between nanosensor response and BSA-nanoblend interaction. It was possible to measure the apparent enthalpy change of interaction ($-42.00 < \Delta_{\text{ap-int}}H < 28.00$ kJ M) between BSA and nanoblends, indicating that this interaction was entropically driven for nanoblend without cholesterol (CHO), while in the presence of lipid it became enthalpically driven, mainly due to a direct interaction between CHO and BSA. As eugenol-BSA complex did not interact with nanoblend, it was not able to induce nanosensor colorimetric transition. We suggest that polydiacetylene-L64 nanoblends are potential low-cost sensors for rapid detection of small amounts of BSA, discriminating between native/denatured and free/bound protein.

Keywords: nanoblend; milk protein; fluorescence; microcalorimetry; zeta potential

1 Introduction

Serum albumins are the most abundant protein in the circulatory system, playing an important role in the transportation and delivery of endogenous and exogenous molecules, especially hydrophobic ones, in the blood (Bolel, Mahapatra, & Halder, 2012; Deng, Wu, & Chen, 2015).

Bovine serum albumin (BSA) detection has attracted increasing attention (Babu et al. 2014; Chen et al. 2010; Hang et al. 2014) mainly due to the application of BSA in different fields such as food, biochemical and immunological sciences.

BSA has been used as a marker of the health of the cow's mammary gland and milk quality (Jantz and Finke 2005), and has been recognized as a significant allergenic protein (Indyk et al. 2015). It is widely used as a protein calibrant (Liu et al. 2015), and it can be used as ligand-carrier in applications relevant to the food and pharmaceutical industry (Basu and Kumar 2015; Cho and Ahn 2013; Shubhra et al. 2014; Y. Zhang and Zhong 2012). To identify, determine, and quantify BSA in different matrices, it is necessary understand its features relating to its composition, conformation and physicochemical properties.

BSA is a carbohydrate-free, 66.4 kDa globular protein present in the whey protein system, comprising about 1.5% and 8.0% (w/w) of total milk protein and whey protein fraction respectively (Indyk et al. 2015). BSA is homologous to human serum albumin (HSA), having about 80% sequence homology with the latter. Its primary sequence consists of 583 amino acid residues, and the molecule has a net charge of -17 at neutral pH. The BSA molecule also consists of 17 intramolecular disulfides and one free thiol group, which help maintain globular structure, and form the three homologous structural domains I, II and III. Each domain is made up of two subdomains A and B (Babu et al. 2014; Kun et al. 2009). There are two tryptophan residues (Trp134 and Trp213), of which the former is placed on the protein interface and the latter is embedded in the hydrophobic pocket of biopolymer. While there are marked similarities between BSA and HSA in terms of their composition, HSA has only one tryptophan residue (Trp 214) which is also placed in the hydrophobic core of the protein (Bolel et al. 2013; Bourassa et al. 2010).

Traditional techniques used to detect BSA are often based on spectrometric methods (Fengling et al. 2014; Lee et al. 2003; Wang et al. 2015). However, these methods suffer limitations such as complicated steps, expensive equipment, limited sensitivity and narrow linear range, and in some cases these methods require shortening of the detection time. Therefore, it is necessary to develop alternative ways to detect small amounts of BSA in different matrixes, in real-time.

Polydiacetylenes (PDAs) are conjugated polymers with the unique intrinsic ability to respond to different stimuli, undergoing blue-to-red transition (Varghese Hansen et al. 2015; Zhou et al. 2013). Using colorimetric changes, some systems based on PDAs have been constructed to detect bacteria (Pires et al. 2011), toxins (Nagy et al. 2008), enzymes (Rozner et al. 2003), viruses (Jiang, Luo, Dong, Wang,

Jin, et al. 2015), surfactants (Nopwinyuwong et al. 2014), solvents (Pires et al. 2010; Tong et al. 2011), metals (Narkwiboonwong et al. 2011), and others. These chromic properties makes PDA suitable for use in sensor systems, with several merits such as simple and rapid detection, easy recognition through naked eye color change, and label-free detection (Jiang, Luo, Dong, Wang, Wen, et al. 2015).

PDAs may exist in self-assembled form in different structures, such as liposomes or vesicles (Lu et al. 2014; Pimsen et al. 2014), films (Champaiboon et al. 2009), and nanocomposites (Nopwinyuwong et al. 2014; Toommee et al. 2015), based on the preparation method, and /or chemical nature of the molecules used in synthesis (Tong et al. 2011). In addition, colorimetric transition in these sensor systems is dependent on PDA aggregation form (Champaiboon et al. 2009; Pattanatornchai et al. 2013).

The application of PDA vesicles in the detection of different molecules in suspension has been widely studied. However, they have been found to show some limitations, such as low stability for long periods (Lee and Kim 2012), and restricted colorimetric transition for some conditions, that could make difficult the visual detection of color change. It would therefore be useful to develop new PDA-based templates for the efficient use of this polymer as a sensor to detect different molecules.

In this study, nanoblends formed by PDA and triblock copolymer L64 were used to detect BSA. Thermodynamic parameters associated with nanosensor-protein interaction were determined, and the effects of nanoblend composition, protein conformation, and presence of protein-ligand, on the colorimetric transition of polydiacetylenic nanoblends were investigated.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Bovine serum albumin (BSA, 98% wt. pure), 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA, 97% wt.), 10,12-tricosadiynoic acid (TCDA, 98% wt.), cholesterol (99% wt. pure), and eugenol (99% wt. pure) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer (TC) L64 [(EO)₁₃(PO)₃₀(EO)₁₃], with average molar mass (M_m) of 2900 g.mol⁻¹, acquired from Aldrich (USA), was used. Polyvinylidene difluoride (PVDF) syringe

filters (0.33 mm of diameter and 0.45 µm pore) were purchased from Millipore (USA), and Millipore water, were used in all experiments ($R \geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$).

2.2 Nanoblend Production

Nanoblends of PCDA and L64 were prepared by solubilizing L64 in water, at concentration of 1.0% (w/w). PCDA (1 mM) was dissolved in this TC solution, the mixture was sonicated for 10 min (Sonics & Materials Inc., Model VC750), and immediately filtrated through PVDF filter. The suspension was kept overnight at 4°C, with the aim of orientating PCDA monomers in order to promote polymerization. Next, photopolymerization was carried out by exposing the suspension to UV radiation (254 nm), for 6 min, until the suspension turned blue in color.

To investigate the effects of diacetylene monomer, nanoblends containing TCDA (1 mM) instead of PCDA, and L64 1.0% (w/w) were synthesized following the same steps as described above.

2.3 Colorimetric response (CR)

In order to study the interaction between BSA and PCDA/L64 or TCDA/L64 nanoblend, BSA solution (0.75 mM) was added to the nanoblend suspension, to a final concentration of 0.20 mM. The mixtures were stirred for 30 s, and maintained at 25 °C for 1 h, to allow the system to achieve thermodynamic equilibrium. Spectra were obtained between 350 and 900 nm (Shimadzu UV-2550), at 25 °C. To quantify the percentage of blue-to-red conversion of polydiacetylenes, a parameter termed “colorimetric response (CR)” was calculated using Equation 1 (Charych, Nagy, Spevak, Bednarski 1993),

$$\text{CR}(\%) = \left[\frac{\left(\frac{A_{640}}{A_{640} + A_{540}} \right)_b - \left(\frac{A_{540}}{A_{640} + A_{540}} \right)_a}{\left(\frac{A_{640}}{A_{640} + A_{540}} \right)_b} \right] \times 100 \quad (1)$$

where A is the absorbance of blue ($\lambda \sim 640 \text{ nm}$) and red components ($\lambda \sim 540 \text{ nm}$), determined by UV-Vis spectroscopy. The terms “blue” and “red” are related to

material appearance, and the indices “b” and “a” represent the absorbance before and after protein addition, respectively.

As we were interested in evaluating the effect of protein conformation, and bound protein on nanoblend CR, the procedures described above were repeated using the same concentration range, but changing BSA, denatured BSA, and eugenol-bound BSA, respectively.

2.4 Light scattering and electrokinetic measurements

Size and zeta potential of nanostructures were measured at 25 °C, with a Zetasizer nano ZS90 (Malvern). Samples were diluted 20 times to avoid blue color interference on the measurements. Each experiment was repeated 3 times, and each result was presented as the average of 10 measurements.

2.5 Fluorescence Experiments

Fluorescence spectra of protein were recorded in a CaryEclipse Fluorescence Spectrometer (Agilent), using a 1/cm path length quartz cuvette. Nanoblend aliquots were added to the protein (BSA or denatured-BSA) solution (0.75 mM), and the fluorescence emission spectra were recorded between 296 and 500 nm, at the excitation wavelength of 295 nm, which is specific for tryptophan residue excitation.

2.6 Isothermal titration microcalorimetric (IT μ C) experiments

Titration analyses were performed in an isothermal titration microcalorimeter (IT μ C), model CSC 4200 (Calorimeter Science Corporation), controlled by ITCRun software. The microreaction system (1.8-mL stainless steel vessels for sample and reference), containing PCDA/L64 or TCDA/L64 nanoblends, was maintained under constant stirring at 300 rpm, and analyzed in titration mode. When thermal equilibrium between the vessel and the heat sink was reached, 10- μ L aliquots of protein (BSA, denatured-BSA or eugenol-bound BSA) solution were titrated with a Hamilton microliter syringe at 500 s intervals, until protein concentration of 0.20 mM was achieved.

For each injection, the experimental enthalpy change (ΔH) was obtained by raw data peak integration. The values of integrated molar enthalpy change were

obtained by dividing “ ΔH ” by the number of moles of BSA added in each injection ($\Delta_{\text{Obs}}H$). A control experiment was carried out in each run to determine the dilution enthalpy change ($\Delta_{\text{dil}}H$), by injecting BSA solution into nanoblend solvent (copolymer L64).

As the amount of BSA molecules bound per PCDA was not known, it was not possible to calculate the exact molar enthalpy change of interaction. Therefore, an apparent enthalpy change of interaction ($\Delta_{\text{ap-int}}H$) was determined, whose curve provides important qualitative information about BSA-nanoblend interaction, for increasing BSA concentrations. $\Delta_{\text{ap-int}}H$ is calculated from the difference between $\Delta_{\text{Obs}}H$ and $\Delta_{\text{dil}}H$ curves.

All calorimetric measurements were performed in triplicate, and the calculated relative standard deviation in the interaction enthalpy was found to be of the order of 0.5%.

2.7 Differential scanning nanocalorimetric (Nano-DSC) experiments

A nano-DSC (Nano DSC 6300-A, TA instruments, USA) was used to investigate nanoblend-protein interaction. Sample (0.3 mL) of protein (BSA, or eugenol-bound BSA) solution at 0.75 mM, containing or not containing nanoblend (1:1), was heated from 20 to 110 °C at a rate of 1 °C/min. All samples were degassed in low pressure chamber before measurement. The collected data was corrected for calorimetric baseline.

From the thermograms, the denaturation temperature (T_m) corresponding to the maximum of the transition peak, and denaturation enthalpy change ($\Delta_{\text{den}}H$), was obtained by calculating the area below the transition peak.

3 Results and discussion

3.1 Optical properties of polydiacetylenic nanostructures

To evaluate the potential application of new PCDA nanostructures as sensors for BSA, it is necessary to determine their optical properties and their dependence on nanostructure composition, size, and surface properties.

To understand nanosensor synthesis, it must be considered that triblock copolymers molecules (PEO-PPO-PEO) can self-assemble in micelles, depending on

temperature and concentration. According to Castrillon (2013), these can form a hydrophobic core of PPO segments able to solubilize diacetylene monomers. Since L64 critical micellar concentration (c.m.c) is 0.35% (w/w) at 25 °C (Causse et al., 2010), mixtures of copolymer aqueous solution (1.0%, w/w) and PCDA monomers produced aggregates containing a hydrophobic core composed of PO segments and the hydrophobic tails of the PCDA monomers. At the hydrophobic/hydrophilic aggregate interface, the PCDA carboxylic groups are orientated towards the hydrophilic shell formed by the EO segments (Figure 1).

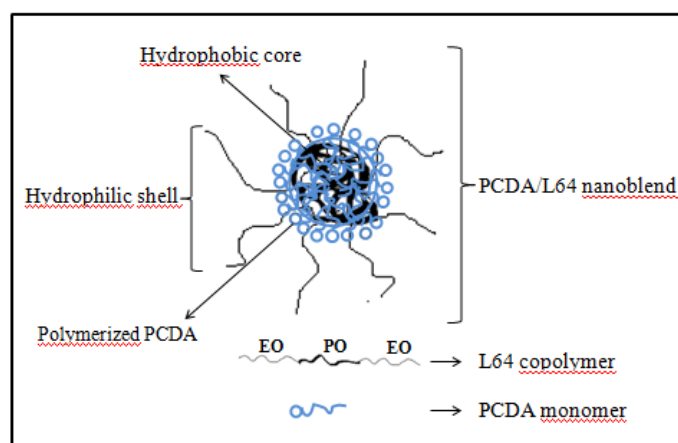


Figure 1 – Schematic representation of PCDA/L64 nanoblend.

Due to specific interactions between cholesterol and BSA, lipid addition to the PCDA/L64 nanostructure may increase the nanosensor's efficiency for detecting this protein. The cholesterol added to the PCDA/copolymer mixture was found to be dissolved in the hydrophobic region, and/or at interface of the nanoblend, interacting with PO segments and PCDA monomers, and possibly altering the polymerization yield and/or the sensitivity of nanosensor.

To investigate the potential effects of cholesterol on polymerization yield, UV-visible spectra of nanoblends with different cholesterol composition were obtained (Figure 2).

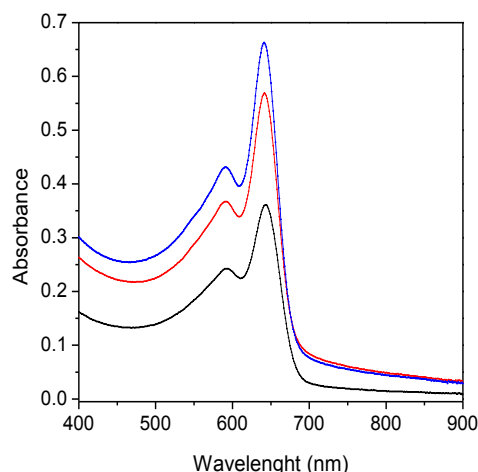


Figure 2 – UV-vis spectra of PDA/L64 nanoblends, containing: (—) 0 mM, (—) 1 mM, and (—) 3 mM cholesterol.

The presence of either copolymer or cholesterol did not inhibit diacetylene polymerization, and the electronic spectra of all nanoblends were found to present similar profiles, with maximum absorption band at 640 nm, and a shoulder at 590 nm. However, the intensity of both bands increased with increasing cholesterol concentration, showing that the presence of lipid increased the polymerization yield. As the PCDA polymerization process is dependent on the orientated packaging of PCDA monomers, this increase in intensity indicates that cholesterol induced improved PCDA self-aggregation.

In addition to the polymerization yield, cholesterol was found to affect nanoblend hydrodynamic diameter (D_h), and zeta potential (ξ). Nanoblends without cholesterol presented D_h and ξ equal to 78.2 ± 1.39 nm and -22.2 ± 0.12 mV, respectively. The addition of cholesterol resulted in the nanostructure being smaller (65.8 ± 0.94 , 62.9 ± 1.28 and 67.4 ± 1.4 nm), and more negatively charged (-29.5 ± 0.66 , -29.5 ± 0.58 and -28.3 ± 0.75 mV), for cholesterol concentrations equal to 1, 2, and 3 mM, respectively. The lipid effect on the nanoblend size and surface charge corroborated with the hypothesis that cholesterol molecules should be located at hydrophobic/hydrophilic interface and in the hydrophobic core of nanoblends.

3.2 Polydiacetylene nanoblend as optical nanosensor for BSA

It has been recognized that PCDA nanostructures are able to change their color from blue to red in the presence of proteins, indicating the occurrence of intermolecular interactions between them (Souza et al. 2015). This PCDA color change is due to the energy of the polydiacetylene molecules overcoming the rotational barrier energy (ΔE_{RB}), and changing their conformation from linear (blue) to random coil (red) form. To quantify the extent of PCDA conversion from blue to red form, due to interaction with BSA, we determined the colorimetric response (CR) parameter. Figure 3 illustrates the CR of PCDA/L64 1.0% (w/w), with or without cholesterol, as a function of BSA concentration at 25 °C.

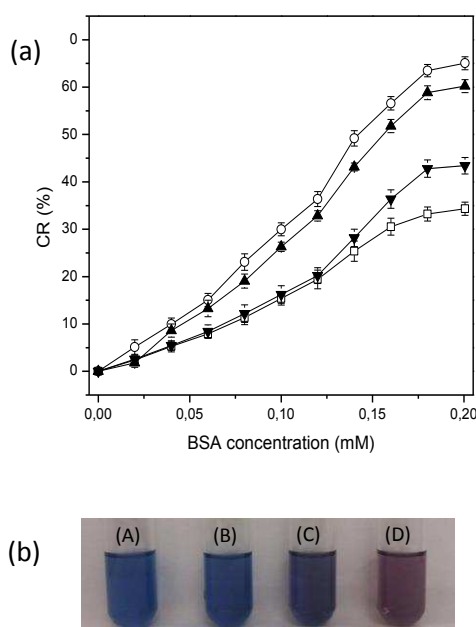


Figure 3 – 3a: Colorimetric response (CR, %) of nanoblends formed by PCDA (1 mM) and L64 1% (w/w), containing cholesterol at concentration ($\square$) 0 mM, ($\circ$) 1 mM, ($\blacktriangle$) 2 mM and ($\blacktriangledown$) 3 mM, as a function of BSA concentration, at 25 °C; 3b: Color appearance of PCDA/L64/CHO 1 mM added from: (A) 0, (B) 0.05, (C) 0.12 and (D) 0.18 mM of BSA.

For all nanoblends, CR was enhanced as BSA concentration increased, achieving a plateau of maximum CR at BSA concentration of around 0.18 mM, with maximum CR of 34%, 65%, 60%, and 43% for PDA/L64 nanoblend containing 0, 1, 2, and 3 mM cholesterol, respectively. Under these thermodynamic conditions, it was not possible to reach 100% of CR, suggesting that some PCDA molecules remained in the blue conformation. It was possible to verify color change by naked

eye for only PCDA/L64/CHO 1 mM and PCDA/L64/CHO 2 mM nanoblends (Figure 4).

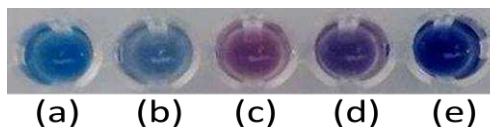


Figure 4 – Color of nanoblends: (a) Control: PCDA/L64, without BSA addition; (b) PCDA/L64, with 0.18 mM BSA; (c) PCDA/L64/CHO 1 mM, with 0.18 mM BSA; (d) PCDA/L64/CHO 2 mM, with 0.18 mM BSA; and (e) PCDA/L64/CHO 3 mM, with 0.18 mM BSA.

At 1 and 2 mM, the presence of cholesterol improved the sensitivity of PCDA nanosensor for BSA detection, suggesting a specific interaction between the protein and lipid, and/or intermolecular interactions between PCDA and CHO, decreasing the PCDA ΔE_{RB} . Nevertheless, it is interesting to note that CR reduced when CHO concentration increased to 3 mM. This CR reduction may be related to PCDA stabilization (enhancing ΔE_{RB}), caused by cholesterol concentration increasing, since it is known that at higher cholesterol concentration the lipid segregation process may limit the conformational freedom of PCDA (Kolusheva et al. 2003).

To evaluate whether cholesterol addition into nanoblend changes ΔE_{RB} , we carried out thermochromism experiments with nanoblends containing different concentrations of CHO (Figure 5).

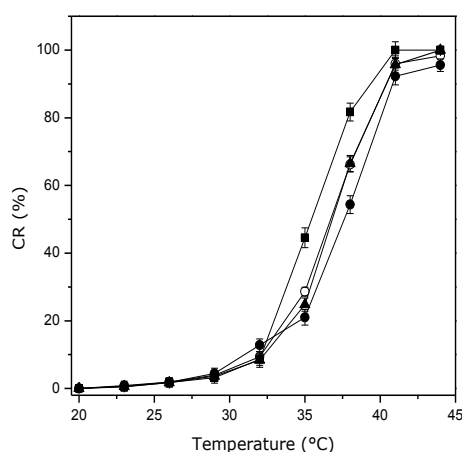


Figure 5 – Colorimetric response (CR, %) of nanoblends formed by PCDA (1 mM) and L64 1% (w/w) containing cholesterol concentrations (■) 0 mM, (○) 1 mM, (▲) 2 mM, and (●) 3 mM, as a function of temperature.

At a lower temperature range (20–30 °C), CR values were found to be almost constant, increasing abruptly at 30 °C, and becoming constant after 40 °C. The inflexion point of CR versus temperature curve characterizes a critical temperature (T_c), at which the PCDA colorimetric transition occurs, induced by molecular collision energy transference, with higher T_c values being associated with higher rotational barrier. At high temperatures, the PCDA average kinetic energy is enhanced, allowing energy transference between PCDA molecules by molecular collision, which leads to polydiacetylene overcoming ΔE_{RB} , and changing its color from blue to red. The following order for T_c values was observed: PCDA/L64 < PCDA/L64/CHO 1 mM = PCDA/L64/CHO 2 mM < PCDA/L64/CHO 3 mM.

These results show that on increasing cholesterol concentration, ΔE_{RB} values increased slightly, demonstrating that the higher sensitivity of PCDA/L64/CHO 1 mM should not be attributed to decreasing ΔE_{RB} . Therefore, this higher sensitivity seems to occur due to specific BSA-CHO interactions at the BSA-PCDA/L64/CHO 1 mM complex interface. A study carried out by Charbonneau, Beauregard, & Tajmir-Riahi (2009) corroborates with this hypothesis, since they found a binding constant (K) between cholesterol and BSA at 25 °C, equal to $1.12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. On the other hand, for BSA-PCDA/L64/CHO 3 mM nanoblend, cholesterol molecules could be segregated in pure nano-domains, increasing the CHO-CHO interaction to the extent that BSA-CHO interaction was avoided. Bukiya et al. (2011) demonstrated this same phenomenon, termed “cholesterol condensation effect” in liposomes.

The interaction between nanoblends and the biopolymer may change nanoaggregate structure, size and surface properties such as zeta potential. This structural effect caused by BSA may provide information on the molecular process underlying colorimetric transition. Figures 6a and 6b show change in nanoblend diameter and zeta potential as BSA concentration is increased.

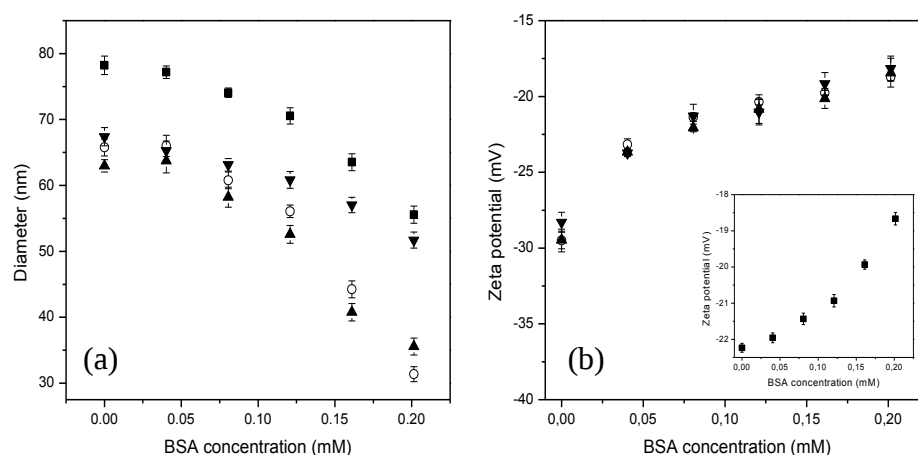


Figure 6 – Effect of BSA addition on (a) hydrodynamic diameter, and (b) zeta potential of nanoblends containing (■) 0 mM, (○) 1 mM, (▲) 2 mM and (▼) 3 mM cholesterol, as a function of BSA concentration, at 25 °C.

Since L64 concentration in nanoblend aqueous suspension is above c.m.c., the occurrence of L64 micelle formation, with size of approximately 10 nm at 25 °C, is possible (Alexandridis and Hatton 1995). However, our results showed that nanoblend aggregate size measured by light scattering was between 62 and 78 nm, which demonstrates that its structure is higher than L64 micelles, possibly due to a higher number of L64 molecules (higher aggregation number).

The increasing cholesterol concentration decreased the hydrodynamic diameter of polydiacetylene/copolymer nanoblends, pointing to a higher packaging degree of molecules, and/or a lower aggregation number in the presence of the lipid, possibly due to a preferential interaction between cholesterol and polydiacetylene molecules, and/or cholesterol and propylene oxide segments.

The addition of BSA to nanoblend aqueous suspension (in the same concentration range that was used in the CR experiments) led to a reduction in nanoblend diameter. Nanoblends with higher CR (containing 1 and 2 mM CHO) reduced by around 50% of their diameter, while the others reduced by only 30% (Figure 6a). This higher decrease in the size of nanoblends with higher CR is due to increased polydiacetylene conversion from blue to red form, by linear-coil transition altering molecular packing degree (Carpick et al. 2004).

BSA has isoelectric point at pH 4.6 (Indyk et al. 2015); since the pH of the nanoblend system was around 8.5, the protein was negatively charged in this

condition. In order to ensure that values of zeta potential obtained in the present experiment were related to nanoblends, and not to BSA, we measured the zeta potential of BSA in the L64 solution, and found it to be -13.2 ± 0.4 mV. This shows that the values of zeta potential from Figure 6b are clearly related to nanoblends.

All nanoblends were found to be negatively charged, with a decrease in their zeta potential (from -22.0 to -29.0 mV) in the presence of cholesterol. As this lipid is not ionized at the pH of nanoblend aqueous suspension (pH 8.5) due to the pKa of hydroxyl group of cholesterol being around 15 (Rimnácová et al. 2014), the effect of cholesterol on the surface charge of nanoblends is due to CHO-PCDA interactions (mainly hydrogen bonding), which promote changes in the degree of ionization of carboxylic groups at the nanoblend interface. This effect was not found to be dependent on cholesterol concentration, possibly because at above 1 mM cholesterol, the nanoblend interface is saturated and lipid molecules diffuse inside the nanoblend forming nano-domains, intensifying CHO-CHO interaction.

On protein addition to nanoblend suspension, nanostructure zeta potential became less negative, indicating that BSA-PCDA/L64 nanoblend interactions neutralized some of the negative charge at the nanosensor interface. Despite the overall charge of BSA being negative, some protein amino acid residues are positively charged, allowing a direct electrostatic interaction between these and the negatively charged carboxylic groups of PCDA.

Fluorescence spectroscopy offers a powerful technique for the study of intermolecular interaction between BSA and PCDA/L64 nanoblends, by measuring biopolymer quenching emission intensity when protein-nanoblend complexes are formed in the fluorophore fundamental state. BSA fluorescence results from 2 tryptophan residues, which when excited at 295 nm emit electromagnetic radiation at a wavelength range of between 320 and 370 nm.

To measure binding constant (K_a), and standard Gibbs free energy (ΔG°), for BSA-nanoblend complex formation, we obtained BSA fluorescence spectra in the presence of increasing PCDA concentration (Figure 7).

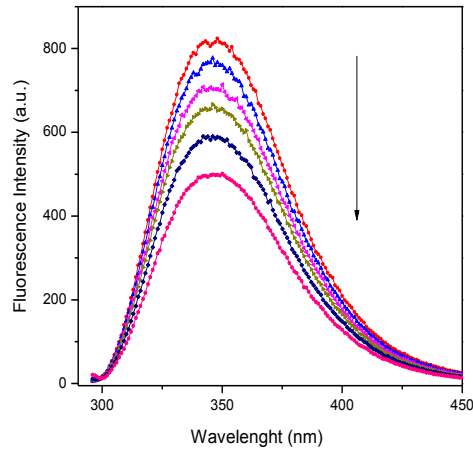


Figure 7 – Fluorescence spectra of BSA in the presence of different concentrations of PCDA, at 25 °C. The arrow indicates increasing PCDA concentration, from 0 to 0.50 mM.

The BSA fluorescence intensity was found to reduce and there was a displacement in the maximum peak (around 5 nm) as PCDA concentration increased, indicating BSA-PCDA complex formation (Li et al. 2015). To determine BSA-nanoblend binding constant (K_a), we followed Stern-Volmer approach using Equation 2.

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_a + n \log [PCDA] \quad (2)$$

where “ F_0 ” and “ F ” are the fluorescence intensities of BSA, in the absence and presence of quencher (in this case PCDA, since pure L64 micelle did not quench BSA fluorescence), respectively. K_a and “ n ” denote the binding constant for BSA-PCDA interaction, and the complex stoichiometry, respectively. K_a and n values can be calculated by linear regression of $\log [(F_0 - F)/F] \times \log [PCDA]$ plots (Figure 8).

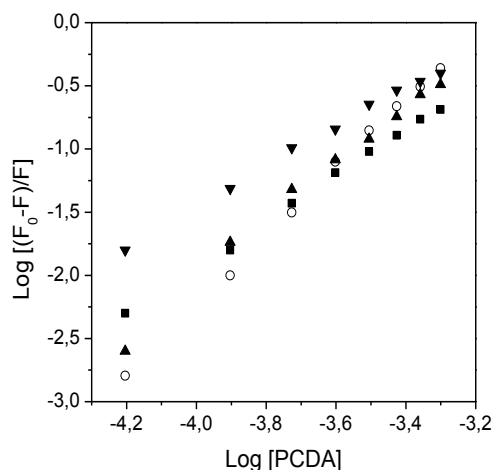


Figure 8 – Log [(F₀-F)/F] versus Log [PCDA] plots for BSA-nanoblend interaction, at 25 °C, promoted by different nanoblends (■) PCDA/L64, (○) PCDA/L64/CHO 1 mM, (▲) PCDA/L64/CHO 2 mM and (▼) PCDA/L64/CHO 3 mM.

Using Equation 3, it is possible to calculate ΔG° for complex formation. If $\Delta G^\circ < 0$, then the equilibrium $\text{BSA} + \text{PCDA} \leftrightarrow \text{BSA-PCDA}$ shifts to BSA-PCDA complex formation, while $\Delta G^\circ > 0$ favors the presence of reactants.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad (3)$$

where R is ideal gas constant ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T is absolute temperature (K) and K_a is binding constant. K_a , “n” and ΔG° values obtained for BSA interaction with the different nanoblends are found in Table 1.

Table 1 – Binding constant (K_a), complex stoichiometry (n), and standard free Gibbs energy change (ΔG°) for BSA-PCDA complex formation, at 25 °C.

Nanoblend	$K_a (10^8 \text{ L mol}^{-1})$	n	R^2	$\Delta G^\circ (\text{kJ mol}^{-1})$
PCDA/L64	0.22 ± 0.01	1.6	0.99	-30.52 ± 1.22
PCDA/L64/CHO 1 mM	4.79 ± 0.19	2.7	0.99	-49.52 ± 1.74
PCDA/L64/CHO 2 mM	1.35 ± 0.05	2.3	0.99	-40.68 ± 1.43
PCDA/L64/CHO 3 mM	0.69 ± 0.02	1.8	0.98	-33.31 ± 1.27

K_a , “n” and ΔG° values depended on nanostructure composition, with the following order for their modulus: PCDA/L64 < PCDA/L64/CHO 3 mM < PCDA/L64/CHO 2 mM < PCDA/L64/CHO 1 mM. It was found that the more intense the BSA-nanoblend interaction (as represented by lower ΔG° values), and the greater the number of PCDA molecules per protein (higher “n”), the more sensitive the nanosensor. The magnitude of ΔG° values shows that BSA-nanoblend interactions should occur through dispersive interactions (van der Waals and London forces), electrostatic forces, and hydrogen bonding between PCDA carboxylic groups present at the nanoblend hydrophobic/hydrophilic interface, and amino and carboxyl groups of BSA amino acid residues.

To characterize the BSA-nanoblend complex formation process in greater detail, the enthalpic contribution for BSA-nanoblend interaction was determined by microcalorimetric assays. Figure 9 shows the apparent interaction enthalpy change ($\Delta_{ap-int}H$) between BSA and PCDA/L64 nanoblends, containing or not containing cholesterol, versus BSA concentration.

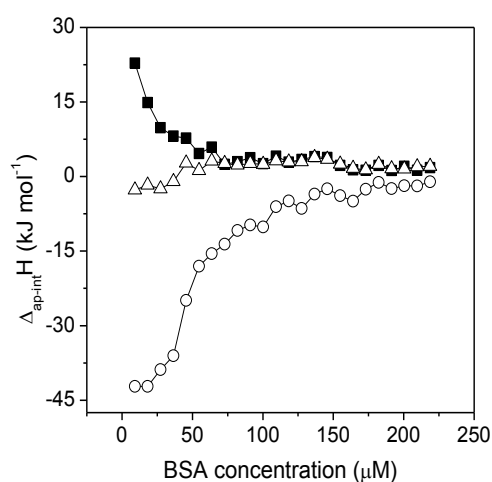


Figure 9 – $\Delta_{ap-int}H$ between BSA and PCDA/L64 nanoblends containing (■) 0 mM, (○) 1 mM, and (Δ) 3 mM cholesterol, as a function of BSA concentration.

In the absence of cholesterol, interaction between BSA and the nanoblend was found to be an endothermic process for all BSA concentrations, with $\Delta_{ap-int}H$ of 22.82 kJ.mol⁻¹, at a concentration of 9.11 μM BSA (first injection). The $\Delta_{ap-int}H$ decreased as BSA concentration increased, therefore showing that an increase in biopolymer content decreased the number of nanoblend free interaction sites. At a

protein concentration of 164.00 μM (PCDA/BSA ratio of 1,5), $\Delta_{\text{ap-int}}H$ became constant at almost zero, indicating the saturation of nanoblend sites. The calorimetric saturation BSA concentration was close to CR saturation point (180 μM), demonstrating that when nanoblend sites were saturated, colorimetric transition reached its maximum value. The more intense $\Delta_{\text{ap-int}}H$ occurred at BSA concentrations between 0 and 75 μM , which in the CR curve correspond to BSA concentrations that induced only 10% of blue to red conversion. In order to understand this relatively small effect of PCDA colorimetric transition on $\Delta_{\text{ap-int}}H$ values, we must consider that $\Delta_{\text{ap-int}}H$ values are influenced by six molecular processes, including enthalpic change due to desolvation of PCDA ($\Delta_{\text{des-PCDA}}H$) and BSA ($\Delta_{\text{des-BSA}}H$) surfaces, interaction between PCDA and BSA ($\Delta_{\text{PCDA-BSA}}H$), PCDA conformational change ($\Delta_{\text{conf}}H$), reduction in PCDA ionization degree ($\Delta_{\text{ion}}H$), and change in nanostructure size ($+\Delta_{\text{size}}H$ for decrease, and $-\Delta_{\text{size}}H$ for increase, in nanoblend size), as shown in Equation 4.

$$\Delta_{\text{ap-int}}H = \Delta_{\text{des-PCDA}}H + \Delta_{\text{des-BSA}}H + \Delta_{\text{PCDA-BSA}}H + \Delta_{\text{conf}}H + \Delta_{\text{ion}}H + \Delta_{\text{size}}H \quad (4)$$

As shown in Figures 3a, 6a, and 6b, at a BSA concentration range of between 0 and 75 μM , there was a small change in the following parameters: CR, ionization degree and nanostructure size. Therefore, the enthalpic parameters $\Delta_{\text{conf}}H$, $\Delta_{\text{ion}}H$, and $\Delta_{\text{size}}H$ were found to contribute only slightly to the magnitude of $\Delta_{\text{ap-int}}H$, showing that the main contributors to its value were the energies from PCDA and BSA desolvation ($\Delta_{\text{des-PCDA}}H$, $\Delta_{\text{des-BSA}}H$, respectively), and PCDA-BSA interaction ($\Delta_{\text{PCDA-BSA}}H$). As $\Delta_{\text{ap-int}}H$ values were found to be always positive, the energetic cost for desolvating PCDA and BSA molecules was higher than the energy released when both molecules interacted. These findings indicate that the BSA-nanoblend interaction is driven by an increase in system entropy, caused by the increase in mixture configurational entropy due to BSA and nanoblend desolvating, with water release.

From 75 μM BSA until saturation point, there was a pronounced change in CR, size, and zeta potential of nanoblends, showing that the $\Delta_{\text{conf}}H$, $\Delta_{\text{size}}H$ and $\Delta_{\text{ion}}H$ parameters make an important contribution to $\Delta_{\text{ap-int}}H$ values. Therefore, the very small values for $\Delta_{\text{ap-int}}H$ were probably due to the compensation between positive

($\Delta_{\text{conf}}H$, $\Delta_{\text{ion}}H$, $\Delta_{\text{des-PCDA}}H$, $\Delta_{\text{des-BSA}}H$, and $\Delta_{\text{size}}H$) and negative ($\Delta_{\text{PCDA-BSA}}H$) parameters, according to Equation 4.

On the other hand, at either cholesterol concentration (1 or 3 mM), the interaction process between BSA and nanoblend was exothermic, releasing $-2.68 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (at 3 mM cholesterol) and $-42.20 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (at 1 mM cholesterol), at $9.11 \text{ }\mu\text{M}$ BSA (first injection). $\Delta_{\text{ap-int}}H$ values became less negative with an increase in BSA concentration, until a plateau was reached at BSA concentrations of 160.55 and $182.22 \text{ }\mu\text{M}$, for lipid concentration of 3.0 and 1.0 mM , respectively, again suggesting nanoblend saturation.

As discussed above, for the BSA-nanoblend (0 mM cholesterol) interaction process, the $\Delta_{\text{ap-int}}H$ values obtained in the case of BSA interaction with nanoblend containing lipid (1 and 3 mM cholesterol) resulted from the same molecular processes as described in Equation 4, with four more terms added to show the following enthalpic changes: BSA-cholesterol ($\Delta_{\text{BSA-CHO}}H$), cholesterol-cholesterol ($\Delta_{\text{CHO-CHO}}H$), cholesterol-PCDA ($\Delta_{\text{CHO-PCDA}}H$), and cholesterol-copolymer ($\Delta_{\text{CHO-L64}}H$) interactions.

BSA-nanoblend interaction depended on the nanoblend cholesterol concentration resulting in, at small BSA concentration ($9.11 \text{ }\mu\text{M}$), $\Delta_{\text{ap-int}}H$ being much more negative for 1 mM, than for 3 mM lipid. The more exothermic process of BSA-nanoblend (1 mM CHO) interaction may be attributed to an intense and specific interaction between cholesterol and BSA, that releases more energy (Charbonneau and Tajmir-Riahi, 2010) than is absorbed, to break CHO-PCDA, CHO-L64, and CHO-CHO interactions, i.e., $|\Delta_{\text{BSA-CHO}}H| > |\Delta_{\text{CHO-PCDA}}H + \Delta_{\text{CHO-L64}}H + \Delta_{\text{CHO-CHO}}H|$. On the other hand, for the BSA-nanoblend (3 mM CHO) interaction, less energy was released. This was possibly due to a segregation process involving cholesterol molecules forming nano-domains of pure lipids inside the nanoblend (Bukiya et al. 2011), which demands a higher energy cost ($\Delta_{\text{CHO-CHO}}H$ (3 mM CHO) $>$ $\Delta_{\text{CHO-CHO}}H$ (1 mM CHO)) to break cholesterol-cholesterol interaction that is needed to form BSA-cholesterol bonds. Consequently, the difference between released energy from $\Delta_{\text{BSA-CHO}}H$, and absorbed energy from $\Delta_{\text{CHO-PCDA}}H + \Delta_{\text{CHO-L64}}H + \Delta_{\text{CHO-CHO}}H$ is lower for the BSA-nanoblend (3 mM CHO) interaction.

For both nanoblends, at different lipid concentrations, as BSA concentration increases, $\Delta_{ap-int}H$ becomes less negative. This result occurs because the BSA binding in nanoblend promotes a change in nanostructure size, ionization degree and PCDA macromolecule conformation transition (blue-to-red colorimetric change). These nanoblend structural changes expend energy, causing an increasing in $\Delta_{ap-int}H$ values. For nanoblend (1 mM CHO), the $\Delta_{ap-int}H$ versus BSA concentration curve showed a higher slope, than for the same curve for nanoblend (3 mM CHO). As the ionization degree change for both nanoblends was similar, the $\frac{\partial \Delta_{ap-int}H}{\partial [BSA]}$ difference between 1 mM and 3 mM CHO curves may be attributed to the energy cost of nanostructure size and PCDA conformational change, which was more intense for nanoblend (1 mM CHO).

To verify the contribution of PCDA conformational transition energy for $\Delta_{ap-int}H$ values, we repeated the microcalorimetric experiment, replacing blue nanoblends with red. To determine BSA-red nanoblend interaction, we promoted color transition by heating nanoblends, until 100% of CR was achieved. We then filled calorimeter vessels with these red-form nanoblends. Figure 10 shows the $\Delta_{ap-int}H$ versus BSA concentration curves for protein-red nanoblend interaction, at 25 °C.

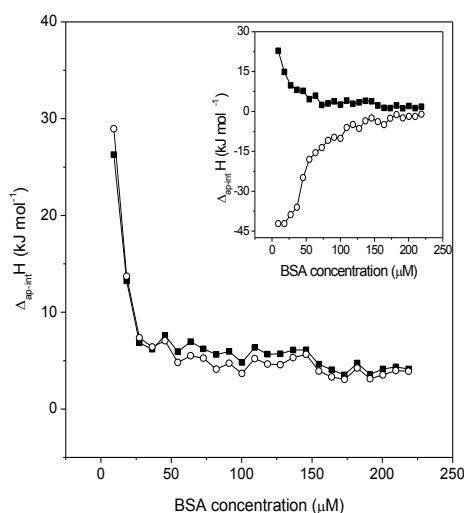


Figure 10 – $\Delta_{ap-int}H$ between BSA and “red” PCDA/L64 nanoblends (the inset corresponds to interaction with “blue” nanoblends) containing (■) 0 mM, (○) 1 mM cholesterol, as a function of BSA concentration.

BSA was found to interact with the nanoblends investigated, regardless of PCDA conformation (red or blue). For all nanosensor compositions, the interaction processes were found to be endothermic, similar to the BSA-blue nanoblend (0 mM

CHO) interaction, and the opposite of that for the BSA-blue nanoblend (1 mM CHO) interaction.

As shown by Equation 4, the difference between $\Delta_{ap-int}H \times [BSA]$ curves for red and blue nanoblends should be attributed to the difference in $\Delta_{conf}H$, $\Delta_{ion}H$, and $\Delta_{size}H$ for both nanostructures, since the PCDA and BSA desolvation energy change ($\Delta_{des-PCDA}H$ and $\Delta_{des-BSA}H$), and PCDA-BSA interaction ($\Delta_{PCDA-BSA}H$) is similar for both blue and red nanostructures. Zeta potential measurements showed that ionization degree dependence on the BSA concentration, for both blue and red nanoblends, was the same (Figure 11), suggesting that $\Delta_{ion}H$ term should not contribute to the difference between $\Delta_{ap-int}H \times [BSA]$ curves for these nanoblends. Therefore, the main contribution to the difference between the two curves should be attributed to $\Delta_{conf}H$ and $\Delta_{size}H$.

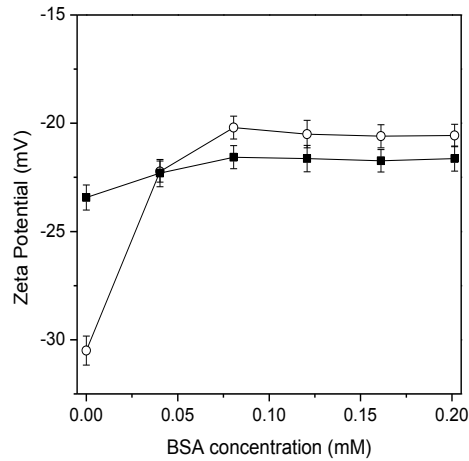


Figure 11 – Effect of BSA addition on zeta potential of nanoblends containing (■) 0 mM and (○) 1 mM cholesterol, as a function of BSA concentration.

As the $\Delta_{ap-int}H \times [BSA]$ curves for blue and red nanostructures (without cholesterol) were similar mainly in the BSA range concentration ($0 < [BSA] < 50 \mu M$) where $\Delta_{ap-int}H$ changed abruptly, we can conclude that there was a compensation process associated with $\Delta_{conf}H$ and $\Delta_{size}H$ parameters ($\Delta_{conf}H = -\Delta_{size}H$). The former contribute only to $\Delta_{ap-int}H$ of blue nanostructure, while $\Delta_{size}H$ is the only determinant for $\Delta_{ap-int}H$ of red nanoblends. The hydrodynamic diameter of the blue nanostructure was almost constant at protein concentration values between 0 and 50 μM (Figure 6a), but there was a pronounced increase in red nanoblends for the same BSA concentration range (Figure 12).

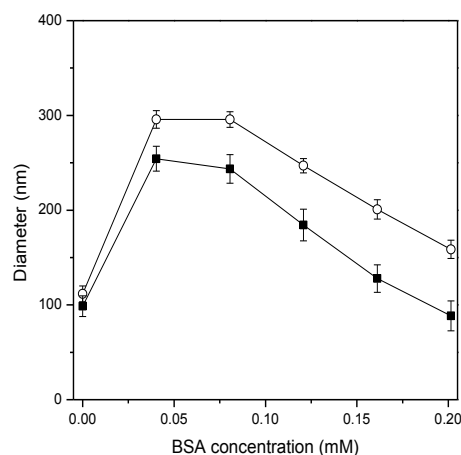


Figure 12 – Effect of BSA addition on hydrodynamic diameter of nanoblends, containing (■) 0 mM and (○) 1 mM cholesterol, as a function of BSA concentration.

For nanoblend containing 1 mM cholesterol, $\Delta_{\text{ap-int}}H \times [\text{BSA}]$ curves for blue nanostructures were exothermic, while for red these were endothermic, indicating different processes of BSA interaction with either nanoblend. The factors contributing to $\Delta_{\text{ap-int}}H_{\text{blue}} \neq \Delta_{\text{ap-int}}H_{\text{red}}$ are: $\Delta_{\text{conf}}H$, $\Delta_{\text{BSA-CHO}}H$, $\Delta_{\text{PCDA-CHO}}H$, $\Delta_{\text{CHO-CHO}}H$ and $\Delta_{\text{size}}H$. As discussed above for nanoblend without cholesterol, $\Delta_{\text{conf}}H$ cancels $\Delta_{\text{size}}H$. Therefore, $\Delta_{\text{ap-int}}H_{\text{blue}} \neq \Delta_{\text{ap-int}}H_{\text{red}}$ is determined by $\Delta_{\text{BSA-CHO}}H$, $\Delta_{\text{PCDA-CHO}}H$, and $\Delta_{\text{CHO-CHO}}H$. In the blue nanoblend, cholesterol is distributed on the core-shell interface, as PCDA molecules are tightly packed, preventing cholesterol diffusion to the nanoblend hydrophobic core, allowing the protein to interact with the lipid. This results in the release of more energy than is expended in the breaking of PCDA-CHO and CHO-CHO bonds, making $\Delta_{\text{ap-int}}H_{\text{blue}}$ negative. On the other hand, due to PCDA conformation change from linear to random coil form (PCDA packing density reduced) in red nanostructures, cholesterol diffusion to the nanoblend hydrophobic core occurs, preventing BSA-CHO interaction. Consequently, $\Delta_{\text{ap-int}}H_{\text{red}}$ is positive due the contribution of $\Delta_{\text{PCDA-CHO}}H$ and $\Delta_{\text{CHO-CHO}}H$.

3.3 The effect of polydiacetylene chain length on sensor properties of nanoblends

ΔE_{RB} , which modulates sensor sensitivity for color transition of polydiacetylenes, is determined by intermolecular interactions occurring between the hydrophobic tails of polydiacetylenes and copolymer segments, cholesterol, and

other polydiacetylene chains. All of these interactions are dependent on polydiacetylene chain size. To assay the effect of hydrophobic tail length of diacetylene monomers on ΔE_{RB} (consequently, on color transition of nanoblends), we replaced PCDA by 10,12-tricosadiynoic acid (TCDA), which has 2 fewer carbon atoms than PCDA. Figure 13 illustrates the TCDA/L64 nanosensor CR as a function of BSA concentration, in the presence or absence of cholesterol.

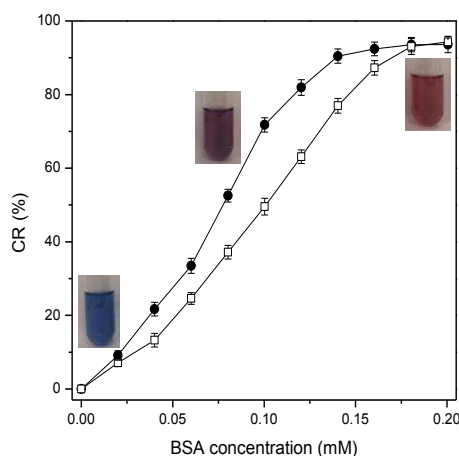


Figure 13 – Colorimetric response (CR, %) of nanoblends formed by TCDA (1 mM) and L64 1% (w/w) at (□) 0 mM and (●) 1 mM cholesterol, as a function of BSA concentration, at 25 °C. Pictures correspond to naked-eye color detection in each curve region.

The replacement of PCDA by TCDA monomers resulted in a remarkable increase in CR, even in the absence of cholesterol. In PCDA/L64 nanoblend, the maximum CR achieved was 34% at a BSA concentration of 0.18 mM (Figure 3a), while for the TCDA/L64 nanoblend, this CR was reached with 0.08 mM protein. The maximum CR was 93%, at 0.18 mM BSA. In the presence of 1 mM cholesterol, CR was also greater for TCDA/L64 than for PCDA/L64 nanoblend. The maximum CR was reached at 0.18 mM for both nanoblends, indicating that the maximum number of sites for BSA interaction at the nanoblend interface was equal for PCDA and TCDA nanostructures. However, the maximum CR value was 65% and 93% for PCDA/L64 TCDA/L64, respectively.

The higher sensitivity of TCDA nanoblends obtained by decreasing only 2 carbon atoms from PCDA, resulted from a rotational barrier reduction due to a decrease in the following interactions: TCDA-TCDA, TCDA-L64 and TCDA-CHO.

In order to understand the molecular basis of the difference between BSA-TCDA/L64 and BSA-PCDA/L64 nanoblend interaction, fluorescence and microcalorimetric experiments were also carried out. For fluorescence analysis, similar to that observed for PCDA/L64 nanoblends, there was a displacement (6 nm) in the wavelength of the maximum peak of BSA emission spectra. Using Stern-Volmer approach, by $\text{Log} [(F_0-F)/F] \times \text{Log} [\text{TCDA}]$ plots (Figure 14), K_a and “n” were obtained, and ΔG° was calculated from Equation 3 (Table 2).

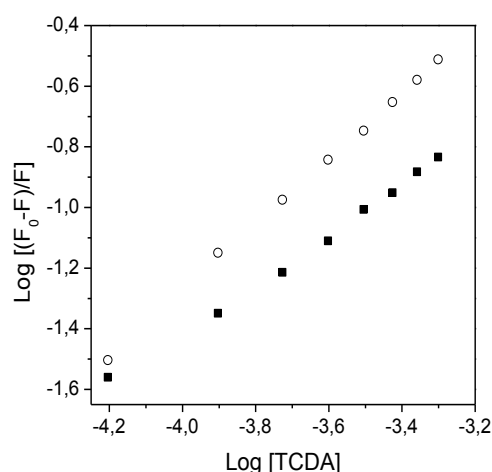


Figure 14 – $\text{Log} [(F_0-F)/F]$ versus $\text{Log} [\text{TCDA}]$ plots for BSA-nanoblend interaction, at 25 °C, produced by the nanoblends (■) TCDA/L64 and (○) TCDA/L64/CHO 1 mM.

Table 2 – Binding constant (K_a), complex stoichiometry (n), and standard free Gibbs energy change (ΔG°) for BSA-TCDA complex formation, at 25°C.

Nanoblend	K_a (10^3 L.mol^{-1})	n	R^2	ΔG° (kJ mol^{-1})
TCDA/L64	0.67 ± 0.02	0.8	0.99	-10.44 ± 0.37
TCDA/L64/CHO 1 mM	1.15 ± 0.03	1.1	0.99	-17.46 ± 0.53

As observed for PCDA nanoblends, more negative ΔG° values for BSA-TCDA nanoblend interaction resulted in more sensitive TCDA nanosensors (TCDA/L64/CHO 1 mM > TCDA/L64), i.e., for the same BSA concentration, a higher CR value was obtained. Despite the higher sensitivity of TCDA nanoblends compared to PCDA ones, the BSA-TCDA interaction energy and complex stoichiometry were found to be lower than those obtained for the BSA-PCDA

complex, confirming that the higher sensor efficiency of TCDA nanoblends result from a rotational barrier energy reduction associated with small diacetylene hydrophobic tails, and not from a more intense interaction between this nanosensor and BSA.

Microcalorimetric data for BSA-PCDA/L64 and BSA-TCDA/L64 nanoblend interactions were similar for nanostructures without cholesterol, in all BSA concentrations studied. On the other hand, for nanoblends with 1 mM lipid, the $\Delta_{\text{ap-int}}H \times [\text{BSA}]$ curve for BSA-PCDA/L64 was exothermic (Figure 9), while for BSA-TCDA/L64 it was endothermic (Figure 15).

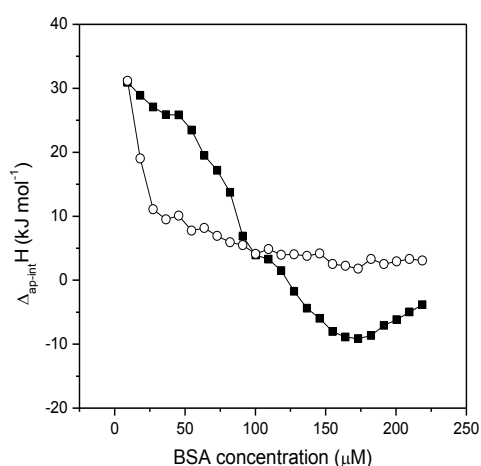


Figure 15 - $\Delta_{\text{ap-int}}H$ versus BSA concentration between BSA and TCDA/L64 nanoblends containing (■) 0 mM and (○) 1 mM cholesterol, at 25 °C.

As the TCDA interaction with nanoblend components is less intense than the PCDA interaction with copolymer, cholesterol and other PCDAs, the molecular packing density is lower in TCDA nanostructure, resulting in cholesterol entrapment inside the nanoblend hydrophobic core. Therefore, cholesterol molecules are not available to interact with BSA, as a result of which this interaction makes no exothermic contribution to $\Delta_{\text{ap-int}}H$ values.

Despite the higher colorimetric sensitivity of TCDA/L64 nanoblends for detection of BSA, these nanoblends show less stability than PCDA/L64 nanostructures during storage. Therefore, we chose to continue this investigation using more stable nanosensors (PCDA/L64 nanoblends).

3.4 Effect of the three-dimensional structure of BSA on the sensor properties of nanoblends

In addition to the effect on nanoblend composition, protein conformation may also influence interaction with nanoblend components (Samanta et al. 2010). BSA is a heart-shaped protein that contains three domains, divided in two sub-domains (A and B), domain I being hydrophilic, and domains II and III hydrophobic (Bolel et al. 2012). To evaluate the effect of protein conformation change on BSA-nanoblend interaction, we performed all previous experiments again, with denatured BSA and nanoblends PCDA/L64 and PCDA/L64/CHO 1 mM. Figure 16 shows the CR of PCDA as a function of denatured BSA concentration.

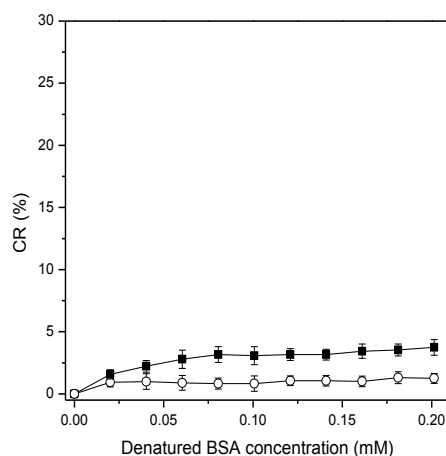


Figure 16 – Colorimetric response (CR, %) of nanoblends formed by PCDA (1 mM) and L64 1% (w/w) containing cholesterol (■) 0 mM and (○) 1 mM, as a function of BSA concentration.

The curve profile for CR as a function of denatured BSA concentration was similar for both nanoblends, achieving a maximum value of 5%. These results indicate that the majority of polydiacetylene molecules are maintained in blue conformation. Therefore, biopolymer three-dimensional conformation is found to play an important role in BSA-PCDA and/or BSA-CHO interactions. It is possible that denatured BSA conformation results in the exposure of many hydrophobic amino acid residues in an aqueous micro-environment, which creates a repulsive interaction between the BSA hydrophobic group and the hydrophilic segments of the poly (ethylene oxide) shell, mainly by volumetric exclusion mechanism (Kuznetsova et al. 2015). This lack of colorimetric response of PCDA/L64 nanoblends in the

presence of denatured protein makes it a useful nanosensor for discriminating native from denatured BSA molecules, therefore providing an important analytical tool for application in many fields (e.g. food, pharmaceutical and health care) in which BSA is used.

In order to confirm the small interaction process between denatured BSA and nanoblends, we carried out fluorimetric and microcalorimetric experiments. Emission spectroscopy showed no fluorescence quenching process, and enthalpy change measurement indicated very small energy values (Figures 17a and 17b), corroborating the hypothesis that small CR values in all BSA concentration ranges are attributable to the negligible interaction between denatured and PCDA/L64 nanostructures.

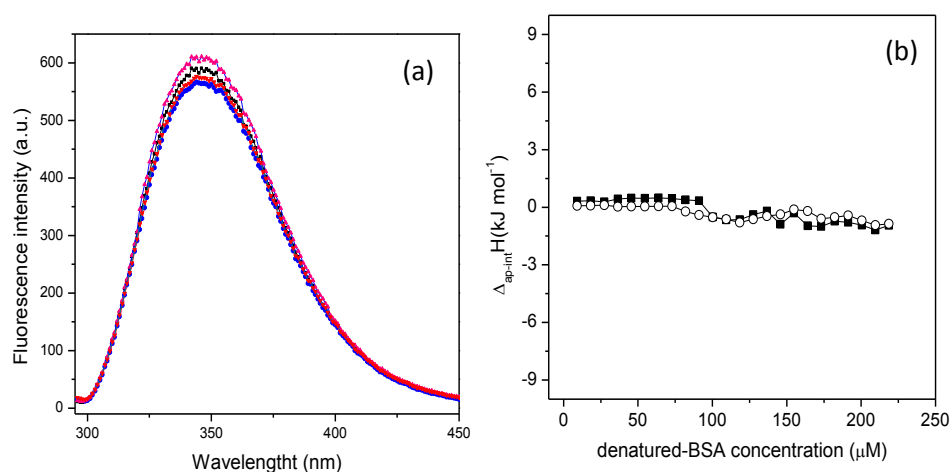


Figure 17 – Fluorescence spectra of denatured-BSA in the presence of different concentrations of PCDA, at 25 °C (a) $\Delta_{ap-int}H$ between denatured-BSA and PCDA/L64 nanoblends containing (■) 0 mM and (○) 1 mM cholesterol, as a function of BSA concentration (b).

3.5 Effect of eugenol-BSA complex formation on interaction between protein and nanoblends

As shown above, protein three-dimensional structure is essential for nanoblend colorimetric response, necessitating the investigation of the effect of BSA hydrophobic sites on BSA-nanoblend interaction. In order to investigate this, we bound BSA with eugenol, which is a poor water soluble molecule that interacts with protein by entrapment into a hydrophobic domain of the biopolymer (Zhang, Ma, Wang, Zhang, & Zhou, 2012), resulting in the amino acid residues located in this

region being unavailable for interaction with the nanoblend. Figure 18 shows the CR of PCDA/L64 nanoblends as a function of BSA concentration, at 25 °C.

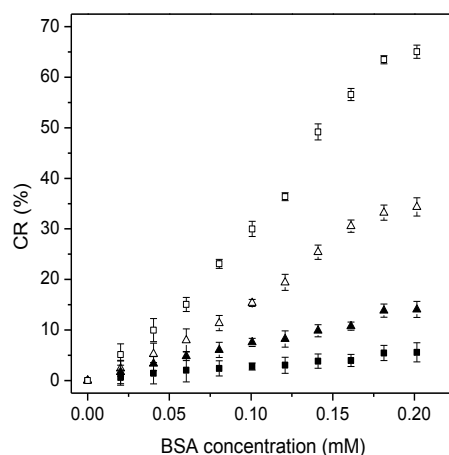


Figure 18 – Colorimetric response (CR, %) of nanoblends formed by PCDA (1 mM) and L64 1% (w/w) (Δ, ▲) 0 mM and (□, ■) 1 mM cholesterol, as a function of eugenol-BSA complex concentration, at 25 °C. Open symbols represent free-BSA and filled symbols represent BSA bound to eugenol.

The presence of eugenol entrapped within the protein molecule was shown to decrease nanoblend CR, for all BSA concentrations studied. The maximum CR values were reduced from 34% (free-BSA) to 14% (eugenol-BSA complex), and from 65% (free-BSA) to 5% (eugenol-BSA complex), for PCDA/L64 and PCDA/L64/CHO 1 mM, respectively. This effect on the nanosensor sensitivity reduction caused by BSA hydrophobic site occupation demonstrates the importance of this region for BSA-nanoblend interaction. The presence of cholesterol in nanoblend was found to increase the CR reduction effect caused by the eugenol-BSA complexation process, corroborating with the previous suggestion that a specific interaction between BSA and cholesterol occurs. Protein-lipid complex formation did not occur in the presence eugenol-BSA complex, due to the occupation of the protein hydrophobic domain (cholesterol location inside BSA) by the phenylpropene.

In order to verify the low interaction intensity between eugenol-BSA complex and nanoblend, microcalorimetric measurements were carried out. Figure 19 shows $\Delta_{ap-int}H \times [\text{eugenol-BSA complex}]$ curves for PCDA/L64 and PCDA/L64/CHO 1 mM nanoblends, at 25 °C.

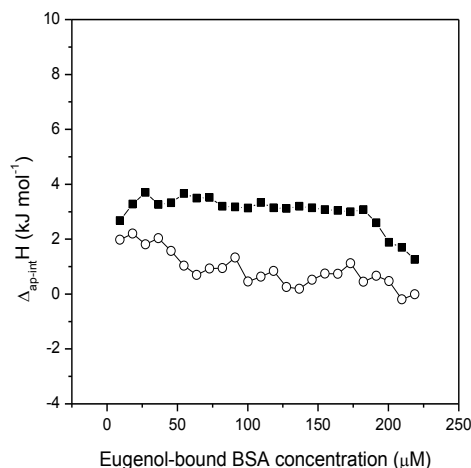


Figure 19 – $\Delta_{\text{ap-int}}H$ between eugenol-bound BSA and PCDA/L64 nanoblends containing (■) 0 mM and (○) 1 mM cholesterol, as a function of BSA concentration.

Eugenol-BSA complex interaction with both nanoblends was found to be endothermic and weak, with $\Delta_{\text{ap-int}}H$ values almost constant, and around 1 and 3 kJ mol⁻¹ for PCDA/L64 and PCDA/L64/CHO 1 mM respectively, at all BSA concentrations. These results confirm that when BSA interacts with eugenol, the protein hydrophobic site is unavailable to interact with cholesterol and/or nanoblend sufficiently to promote colorimetric transition.

3.6 Effect of BSA-nanoblend interaction on protein conformation energy change

The interaction between BSA and nanoblend changes nanostructure optical properties, and could also modify BSA three-dimensional structure, which can be studied by measuring the protein denaturation energy change. In order to verify this biopolymer conformational energy change caused by its interaction with nanosensor, we measured nano-DSC thermograms for BSA, in the presence or absence of nanoblends. Figure 20 illustrates a typical BSA thermogram, obtained in the absence and presence of 0.5 mM PCDA/L64 nanoblend without cholesterol.

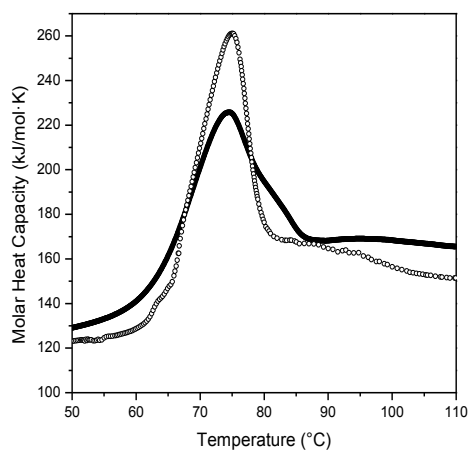


Figure 20 – Thermograms of BSA in aqueous solution (●), and with addition of PCDA/L64 nanoblend (○).

BSA nano-DSC thermogram profiles were found to depend on the nanoblend composition; however, for all BSA-nanoblend interactions no change in maximum temperature of denaturation (74.1 ± 0.4 °C) was observed, showing that this kind of interaction does not affect BSA thermodynamic stability. However, as shown in Figure 21, denaturation enthalpy change ($\Delta_{\text{den}}H$) was influenced by nanoblend type.

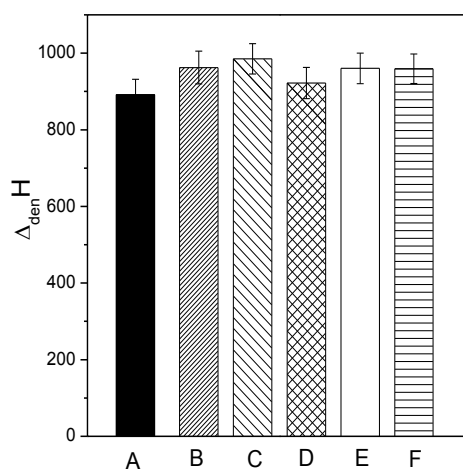


Figure 21 – $\Delta_{\text{den}}H$ values for BSA in aqueous solution (A) and added of different nanoblends: (B) PCDA/L64, (C) PCDA/L64/CHO 1 mM, (D) TCDA/L64, (E) eugenol/BSA-PCDA/L64 and (F) eugenol/BSA-PCDA/L64/CHO 1 mM.

BSA solubilized in aqueous solution showed $\Delta_{\text{den}}H = 891.62 \text{ kJ mol}^{-1}$, which is in agreement with reports in the literature (Giancola et al. 1997). Upon the interaction of BSA with PCDA/L64 and PCDA/L64/CHO 1 mM nanoblends, this

thermodynamic parameter increased to 962.34 kJ mol⁻¹ and 985.38 kJ mol⁻¹ respectively, demonstrating that BSA-PCDA nanoblend interaction promotes enthalpic protein stabilization. BSA-TCDA nanoblend interaction resulted in a lower enthalpic stabilization of the biopolymer, changing $\Delta_{\text{den}}H$ to 922.02 kJ mol⁻¹. This nano-DCS result corroborated the hypothesis that the enthalpy of BSA-TCDA interaction was lower than that of the BSA-PCDA interaction. Despite there being no interaction between the eugenol-BSA complex and nanoblend, the inclusion of eugenol inside the BSA hydrophobic domain changed $\Delta_{\text{den}}H$ to 960.24 kJ mol⁻¹, stabilizing the BSA molecule sufficiently and reducing its interaction with the nanoblends.

Conclusions

An optical nanosensor was synthesized by controlled self-assembly of polydiacetylene and copolymer molecules, and its efficiency of detection of small BSA concentrations was demonstrated. The PCDA/L64 colorimetric transition was induced by a direct interaction between BSA and nanoblends, driven by an increase in entropy, when cholesterol was absent from the nanostructure composition, and driven by enthalpy in the presence of the lipid. A reduction in polydiacetylene hydrophobic tail length by only 2 carbon atoms was found to increase nanosensor sensitivity, mainly by diminishing the polydiacetylene rotational barrier energy. This nanosensor may be applied to determine the binding degree of BSA with hydrophobic compounds, since the eugenol-BSA complex was unable to induce nanoblend color transition. In addition, PCDA/L64 nanostructures showed efficient discrimination between denatured and native BSA, providing a very simple and low-cost analytical tool for ensuring conformational quality control of BSA samples.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq and FAPEMIG for their financial support, and J.P.R would like to thank CNPq for providing a scholarship for this study.

References

- Alexandridis, P., & Hatton, T. A. (1995). DS thermodynamics , structure , dynamics , and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 7757(96), 1–46.
- Babu, E., Muthu, P., & Singaravadivel, S. (2014). Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy A selective , long-lived deep-red emissive ruthenium (II) polypyridine complexes for the detection of BSA. *SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, 130, 553–560. doi:10.1016/j.saa.2014.04.060
- Basu, A., & Kumar, G. S. (2015). Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins: a microcalorimetric investigation. *Food chemistry*, 175, 137–42. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.141
- Bolel, P., Mahapatra, N., Datta, S., & Halder, M. (2013). Modulation of Accessibility of Subdomain IB in the pH-Dependent Interaction of Bovine Serum Albumin with Cochineal Red A: A Combined View from Spectroscopy and Docking Simulations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 4606–4613. doi:dx.doi.org/10.1021/jf305395n
- Bolel, P., Mahapatra, N., & Halder, M. (2012). Optical Spectroscopic Exploration of Binding of Cochineal Red A with Two Homologous Serum Albumins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60, 3727–3734. doi:dx.doi.org/10.1021/jf205219w
- Bourassa, P., Kanakis, C. D., Tarantilis, P., Pollissiou, M. G., & Tajmir-Riahi, H. a. (2010). Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin. *The journal of physical chemistry. B*, 114(9), 3348–54. doi:10.1021/jp9115996
- Bukiya, A. N., Belani, J. D., Rychnovsky, S., & Dopico, A. M. (2011). Specificity of cholesterol and analogs to modulate BK channels points to direct sterol – channel protein interactions. *The Journal of General Physiology*, 137(1), 93–110. doi:10.1085/jgp.201010519
- Carpick, R. W., Sasaki, D. Y., Marcus, M. S., Eriksson, M. A., & Burns, A. R. (2004). Polydiacetylene films : a review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. *JOURNAL OF PHYSICS: CONDENSED MATTER*, 16, 679–697. doi:10.1088/0953-8984/16/23/R01
- Castrillon, E.D.C. (2013) Nanosensores opticos de polidiacetileno para el reconocimiento de moleculas de interes ambiental y alimenticio. *Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.*
- Causse J., Oberdisse J., Jestin J. & Lagerge S. (2010) Small-Angle Neutron Scattering Study of Solubilization of Tributyl Phosphate in Aqueous Solutions of L64 Pluronic Triblock Copolymers. *Langmuir*, 26(20), 15745–15753.

- Champaiboon, T., Tumcharern, G., Potisatityuenyong, A., Wacharasindhu, S., & Sukwattanasinitt, M. (2009). A polydiacetylene multilayer film for naked eye detection of aromatic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 139(2), 532–537. doi:10.1016/j.snb.2009.03.047
- Charbonneau, D., Beauregard, M., & Tajmir-Riahi, H. A. (2009). Structural analysis of human serum albumin complexes with cationic lipids. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(6), 1777–1784.
- Charych, D.H., Nagy, J.O., Spevak, W., Bednarski, M. D. (1993). Direct colorimetric detection of a receptor-ligand interaction by a polymerized bilayer assembly. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5121), 585–588. doi:10.1126/science.8342021
- Chen, X., Xiang, Y., & Tong, A. (2010). Facile, sensitive and selective fluorescence turn-on detection of HSA/BSA in aqueous solution utilizing 2,4-dihydroxyl-3-iodo salicylaldehyde azine. *Talanta*, 80(5), 1952–8. doi:10.1016/j.talanta.2009.10.053
- Cho, Y.-S., & Ahn, K. H. (2013). Molecular interactions between charged macromolecules: colorimetric detection and quantification of heparin with a polydiacetylene liposome. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(8), 1182. doi:10.1039/c2tb00410k
- Deng, K., Wu, Y., & Chen, Q. (2015). *Sensors and Actuators B : Chemical* BDAZn-GO complex as turn-on selective sensor of BSA, 212, 512–516. doi:10.1016/j.snb.2015.02.052
- Fengling, S., Yingying, X. U. E., Xu, W., & Jingyun, W. (2014). Ratiometric Fluorescent Probe Based on Novel Red-emission BODIPY for Determination of Bovine Serum Albumin, 30(44), 738–742. doi:10.1007/s40242-014-4029-7
- Giancola, C., De sena, C., Fessas, D., Graziano, G., & Barone, G. (1997). Giancola et al. 1997_DSC.pdf. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20, 193–204.
- Hang, Y., Yang, L., Qu, Y., & Hua, J. (2014). A new diketopyrrolopyrrole-based near-infrared (NIR) fluorescent biosensor for BSA detection and AIE-assisted bioimaging, 55, 6998–7001. doi:10.1016/j.tetlet.2014.10.108
- Indyk, H. E., Gill, B. D., & Woollard, D. C. (2015). An optical biosensor-based immunoassay for the determination of bovine serum albumin in milk and milk products, 47, 72–78.
- Jantz, A., & Finke, B. (2005). An improved analytical approach for the determination of bovine serum albumin in milk To cite this version : Original article An improved analytical approach for the determination of bovine serum albumin in milk. doi:10.1051/lait
- Jiang, L., Luo, J., Dong, W., Wang, C., Jin, W., Xia, Y., et al. (2015). Development and evaluation of a polydiacetylene based biosensor for the detection of H5

- influenza virus. *Journal of virological methods*, 219, 38–45.
doi:10.1016/j.jviromet.2015.03.013
- Jiang, L., Luo, J., Dong, W., Wang, C., Wen, J., Xia, Y., et al. (2015). Development and evaluation of a polydiacetylene based biosensor for the detection of H5 influenza virus. *Journal of virological methods*, 219, 38–45.
doi:10.1016/j.jviromet.2015.03.013
- Kolusheva, S., Wachtel, E., & Jelinek, R. (2003). Biomimetic lipid / polymer colorimetric membranes : molecular and cooperative properties. *Journal of Lipid Research*, 44, 65–71. doi:10.1194/jlr.M200136-JLR200
- Kun, R., Szekeres, M., & Dékány, I. (2009). Isothermal titration calorimetric studies of the pH induced conformational changes of bovine serum albumin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 96(3), 1009–1017. doi:10.1007/s10973-009-0040-5
- Kuznetsova, I. M., Zaslavsky, B. Y., Breydo, L., Turoverov, K. K., & Uversky, V. N. (2015). Beyond the Excluded Volume Effects: Mechanistic Complexity of the Crowded Milieu. *Molecules*, 20, 1377–1409. doi:10.3390/molecules20011377
- Lee, J., & Kim, J. (2012). Multiphasic Sensory Alginate Particle Having Polydiacetylene Liposome for Selective and More Sensitive Multitargeting Detection.
- Lee, S. H., Suh, J. K., & Li, M. (2003). Determination of Bovine Serum Albumin by Its Enhancement Effect of Nile Blue Fluorescence, 24(1), 45–48.
- Li, X., Wang, G., Chen, D., & Lu, Y. (2015). β -Carotene and astaxanthin with human and bovine serum albumins. *FOOD CHEMISTRY*, 179, 213–221. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.133
- Liu, Z., Gonzalez, J. S., Wang, H., Gunasekaran, S., & Runge, T. (2015). Analytical Methods Dairy manure protein analysis using UV-vis based on the Bradford method. *Analytical Methods*, 7, 2645–2652. doi:10.1039/C4AY03006K
- Lu, S., Jia, C., Duan, X., Zhang, X., Luo, F., Han, Y., & Huang, H. (2014). Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Polydiacetylene vesicles for hydrogen peroxide detection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 443, 488–491. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.11.029
- Nagy, J. O., Zhang, Y., Yi, W., Liu, X., Motari, E., Song, J. C., et al. (2008). Glycopolydiacetylene nanoparticles as a chromatic biosensor to detect Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O157:H7. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(2), 700–3. doi:10.1016/j.bmcl.2007.11.055
- Narkwiboonwong, P., Tumcharern, G., Potisatityuenyong, A., Wacharasindhu, S., & Sukwattanasinitt, M. (2011). Aqueous sols of oligo(ethylene glycol) surface

- decorated polydiacetylene vesicles for colorimetric detection of Pb 2+. *Talanta*, 83(3), 872–8. doi:10.1016/j.talanta.2010.10.054
- Nopwinyuwong, A., Kitaoka, T., Boonsupthip, W., Pechyen, C., & Suppakul, P. (2014). Effect of cationic surfactants on characteristics and colorimetric behavior of polydiacetylene/silica nanocomposite as time–temperature indicator. *Applied Surface Science*, 314, 426–432. doi:10.1016/j.apsusc.2014.07.013
- Pattanatornchai, T., Charoenthai, N., Wacharasindhu, S., Sukwattanasinitt, M., & Traiphol, R. (2013). Control over the color transition behavior of polydiacetylene vesicles using different alcohols. *Journal of colloid and interface science*, 391, 45–53. doi:10.1016/j.jcis.2012.10.004
- Pimsen, R., Khumsri, A., Wacharasindhu, S., Tumcharern, G., & Sukwattanasinitt, M. (2014). Colorimetric detection of dichlorvos using polydiacetylene vesicles with acetylcholinesterase and cationic surfactants. *Biosensors & bioelectronics*, 62, 8–12. doi:10.1016/j.bios.2014.05.069
- Pires, A. C. D. S., Soares, N. D. F. F., da Silva, L. H. M., da Silva, M. D. C. H., De Almeida, M. V., Le Hyaric, M., et al. (2011). A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 153(1), 17–23. doi:10.1016/j.snb.2010.09.069
- Pires, A. C. S., Soares, N. F. ., Silva, L. H. M., Silva, M. C. H., Mageste, A. B., Soares, F., & Andrade, J. (2010). the Solvent Effect, (2), 13365–13371.
- Rimnácová, L., Huseka, P., & Simek, P. (2014). A new method for immediate derivatization of hydroxyl groups by fluoroalkyl chloroformates and its application for the determination of sterols and tocopherols in human serum and amniotic fluid by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1339, 154–167. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.007
- Rozner, S., Kolusheva, S., Cohen, Z., Dowhan, W., Eichler, J., & Jelinek, R. (2003). Detection and analysis of membrane interactions by a biomimetic colorimetric lipid/polydiacetylene assay. *Analytical Biochemistry*, 319(1), 96–104. doi:10.1016/S0003-2697(03)00278-1
- Samanta, A., Paul, B. K., & Guchhait, N. (2010). Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology Novel proton transfer fluorescence probe 2-hydroxypyridine and 5- (4-fluorophenyl) -2-hydroxypyridine for studying native , denatured and renatured state of protein Bovine Serum Albumin. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 101(3), 304–312. doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.07.016
- Shubhra, Q. T. H., Tóth, J., Gyenis, J., & Feczko, T. (2014). Surface modification of HSA containing magnetic PLGA nanoparticles by poloxamer to decrease plasma protein adsorption. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 122, 529–36. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.07.025

- Souza, L. C., Rezende, J. P., Pires, A. C. S., Silva, L. H. M., Silva, M. C. H., Castrillon, E. D. C., & Andrade, N. J. (2015). Polydiacetylene/triblock copolymer nanoblend applied as sensor for micellar casein: a thermodynamic approach. *Food chemistry*.
- Tong, L., Cheng, B., Liu, Z., & Wang, Y. (2011). Fabrication, structural characterization and sensing properties of polydiacetylene nanofibers templated from anodized aluminum oxide. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155(2), 584–591. doi:10.1016/j.snb.2011.01.014
- Toommee, S., Traiphol, R., & Traiphol, N. (2015). High color stability and reversible thermochromism of polydiacetylene/zinc oxide nanocomposite in various organic solvents and polymer matrices. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 468, 252–261. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.12.055
- Varghese Hansen, R., Huang, M., Zhan, Z., Sun, G., Yang, J., & Zheng, L. (2015). On the study of electrochromism in multiwalled carbon nanotube–polydiacetylene composites. *Carbon*, 90, 222–230. doi:10.1016/j.carbon.2015.04.027
- Wang, C., Zhou, Y., Zhang, K., Nie, X., & Xia, X. (2015). Talanta Fast and sensitive detection of protein concentration in mild environments. *Talanta*, 135, 102–107. doi:10.1016/j.talanta.2014.12.046
- Zhang, G., Ma, Y., Wang, L., Zhang, Y., & Zhou, J. (2012). Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin. *Food chemistry*, 133(2), 264–70. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.014
- Zhang, Y., & Zhong, Q. (2012). Binding between bixin and whey protein at pH 7.4 studied by spectroscopy and isothermal titration calorimetry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(7), 1880–6. doi:10.1021/jf2050262
- Zhou, G., Wang, F., Wang, H., Kambam, S., & Chen, X. (2013). Colorimetric and Fluorometric Detection of Neomycin Based on Conjugated Polydiacetylene Supramolecules. *Macromolecular Rapid Communications*, 34, 944–948.