

Síntese Direta de Nanopartículas de Ouro Conjugadas com a Enzima Tripsina: Aspectos Estruturais e Morfológicos

Direct Synthesis of Gold Nanoparticles Conjugated with the Enzyme Trypsin: Structural and Morphological Aspects

Leidiane A. Santos,^a José G. M. Siqueira,^a Elaine A. Faria,^b Marccus V. A. Martins,^c Jocélia P. C. Oliveira^{a,*}

^aUniversidade Federal de Catalão, Instituto de Química, CEP 75705-220, Catalão-GO, Brasil.

^bInstituto Federal de Goiás, Departamento de Áreas Acadêmicas, CEP 74968-755, Inhumas-GO, Brasil.

^cInstituto Federal Goiano, Campus Avançado Catalão, Gerência de Ensino, CEP 75701-655, Catalão-GO Brasil.

*E-mail: joceliapereira@ufcat.edu.br

Recebido em: 19 de Março de 2022

Aceito em: 2 de Julho de 2022

Publicado online: 18 de Julho de 2022

This work reports a quick and easy route of synthesis of gold nanoparticles (AuNp) associated with the trypsin (Try) enzyme, single step, as a way of studying the interaction at the nanoparticle/enzyme interface. The results showed that the proposed methodology of the synthesis was efficient, generating the nanobioconjugated system gold nanoparticle coated by the trypsin enzyme and the polyethylene glycol polymer (AuNp-PEG-Try). Through UV-vis spectra confirmed the formation of the surface plasmonic band of gold at 524 nm. The results of infrared spectra confirmed the interactions of a purely electrostatic nature between the enzyme and the surface of the AuNp, evidenced by the displacements of some vibrational modes associated with the enzyme. Morphologically, the images obtained by Transmission Electron Microscopy (TEM) showed polydisperse nanoparticles with spherical geometry, containing an enzymatic layer on the surface of the nanoparticle, with an average diameter of 5 nanometers, while AuNp-Try forms large clusters without PEG. The system remains stable during the 30 days analyzed without significant loss in maximum absorbance. Finally, this material is promising for future studies on the interaction of the trypsin enzyme and its respective substrate, since its chemical structure remains unchanged in the face of the proposed synthesis.

Keywords: Gold nanoparticles; trypsin; electrostatic interaction; bionanoconjugate.

1. Introdução

A produção de nanopartículas de ouro é extensivamente reportada na literatura devido à grande quantidade de características que potencializam esse nanomaterial metálico em várias aplicações.^{1,2} Essas características variam desde as suas propriedades físicas e químicas únicas, biocompatibilidade, transportadores de fármacos, tratamento contra o câncer, entre outras.^{1,3-9} Neste último aspecto, o contato de nanopartículas de ouro com sistemas biológicos desperta a preocupação com efeitos indesejados devido à toxicidade que o nanomaterial pode causar. Em vista disso, Khlebtsov e Dykman fizeram uma revisão crítica sobre vários trabalhos que reportam o contato de nanopartículas de ouro *in vivo* e *in vitro* e concluíram que a funcionalização de nanopartículas de ouro com uma estrutura orgânica reduz efeitos de toxicidade e melhora a biodistribuição dos nanomateriais dentro do sistema biológico.¹⁰

Em se tratando de interação nanopartícula/biomolécula existem dois pontos que merecem destaque: *i*) a ocorrência da funcionalização formando um nanohíbrido capaz de agregar propriedades em ambas às partes; *ii*) garantir que as funções da biomolécula permaneçam ativas diante da bioconjugação com o nanomaterial. Neste último ponto, destaca-se a inativação das funções da enzima, devido ao processo de síntese levar a desnaturação da enzima, causando sua inativação. Diante deste problema, existem inúmeros trabalhos reportando estratégias de como realizar a funcionalização/interação de nanopartículas de ouro com enzimas de maneira a contornar essa dificuldade, garantido com que a enzima se mantenha ativa.¹¹⁻¹³ Especificamente, Kozłowski e co-autores investigaram a interação entre a enzima *E. coli dihydrofolate reductase* e a superfície de nanopartículas de ouro e, puderam demonstrar que a enzima se liga covalentemente à superfície da nanopartícula, mantendo sua função catalítica estável.¹³ Lv *et al.* estudaram um bioconjugado constituído pela enzima tripsina e nanopartículas de ouro e descobriram que a presença da nanopartícula confere estabilidade a enzima e também não afeta a atividade enzimática da tripsina.¹⁴ Outro aspecto que merece destaque é a escolha adequada de matrizes biopoliméricas que podem estar presentes na interface nanopartícula/enzima. Em detrimento

a isso, o uso específico do polietileno glicol (PEG) de média massa molecular próximo a 1000 g/mol influencia na estabilização e no diâmetro das nanopartículas, quando comparado aos outros polietilenos glicólicos com diferentes massas moleculares abaixo ou acima de 1000 g/mol. Essa relação entre massa molecular e as propriedades de tamanho e estabilização foram descritas por Rahme e co-autores, onde eles observaram que o diâmetro de nanopartículas de ouro aumenta proporcionalmente com o aumento do tamanho da cadeia polimérica.¹⁵ Neste aspecto o uso específico do PEG 1000 proporciona um controle melhor tanto do crescimento quanto da estabilização das nanopartículas. Cabe ainda salientar que a maneira com a qual ocorre a imobilização da enzima na superfície da nanopartícula também desempenha um ponto chave na formação de sistemas bionanoconjugados. Neste ponto, existem alguns procedimentos descritos na literatura que garantem a imobilização da enzima na superfície de uma nanopartícula destacando suas vantagens e desvantagens.¹⁶ No entanto, destaca-se a imobilização através da adsorção física por meio de interações eletrostáticas de van der Waals ou interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte, sem que haja a necessidade de modificação (ou funcionalização) da superfície que atuará como suporte. Este tipo de imobilização é considerado um dos mais benéficos para a enzima em relação à preservação do sítio ativo, causando pouca ou nenhuma alteração na estrutura e mantendo a atividade catalítica.

A enzima tripsina é uma Serino protease excretada pelo pâncreas como uma pró-enzima inativa (tripsinogênio). Sua atuação ótima ocorre em pH fracamente alcalino.¹⁷ Essa enzima tem 223 resíduos de aminoácidos dispostos em dois barris beta de seis filamentos, de geometria aproximadamente globular e solúvel em água. Tem peso molecular de 23,3 kDa, e está presente nos sistemas digestivos de vertebrados e invertebrados. É uma enzima digestiva muito específica e catalisa a clivagem de ligações peptídicas apenas no lado carboxílico dos resíduos de lisina e arginina.^{18,19}

Diante desta perspectiva, este trabalho descreve a síntese de um nanobioconjugado constituído pela enzima tripsina e nanopartículas de ouro na presença do polímero polietilenglicol, o qual desempenhou um papel importante no controle do tamanho das nanopartículas, evitando a ocorrência de aglomeração. Especificamente, investigou-se como ocorre a interação entre a superfície da nanopartícula e partes específicas da enzima tripsina, assim como a estabilidade do referido nanobioconjugado.

2. Procedimento Experimental

2.1. Materiais e reagentes

O reagente $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, PEG 1000 e Tripsina de pâncreas bovino foram obtidos da Sigma-Aldrich® e NaBH_4 foi obtido da Synth®. Todas as soluções foram preparadas

com água deionizada pelo sistema Millipore-Q. O PEG 1000 foi utilizado conforme adquirido da Sigma-Aldrich®, sem a realização de purificação.

2.2. Síntese da NpAu-PEG-Tri e NpAu-Tri

O sistema nanopartícula de ouro estabilizada pela enzima tripsina e o polímero polietilenglicol (NpAu-PEG-Tri) e o da nanopartícula de ouro estabilizada pela enzima tripsina (NpAu-Tri) foram obtidos conforme o procedimento a seguir.

Inicialmente a massa de 20 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ foi adicionada em 50 mL de uma solução etanólica (1% v/v em água) e mantida sob agitação e temperatura de 40 °C durante 10 min. Em seguida, em um béquer de 100 mL, sob agitação constante e a temperatura ambiente, misturou-se os 50 mL de solução etanólica de ouro (1 mmol L⁻¹), 0,1 g de polietilenglicol (PEG) e 0,1 mg/mL da enzima tripsina preparada em tampão fosfato de sódio. Após 15 min de agitação gotejou-se vagarosamente 0,5 mL de NaBH_4 (0,5 mmol L⁻¹). A solução final foi mantida sob agitação por 30 min, tempo necessário para a redução dos íons Au^{3+} para Au^0 , evidenciado pela mudança de cor (amarelo para rosa). O pH da solução final foi medido e apresentou valor de 7,8. O mesmo procedimento foi feito para a síntese do nanobioconjugado sem o PEG.

2.3. Técnicas de caracterização

Todas as soluções de HAuCl_4 , PEG, Tripsina, NpAu-Tri e NpAu-PEG-Tri foram analisadas por meio de espectroscopia na região do UV-Vis em um Espectrofotômetro UV-Vis - Varian, Modelo Cary 50 Scan. As caracterizações na região do infravermelho foram feitas com um Espectrofotômetro Modelo R Prestige - 21, Shimadzu com resolução de 4 cm⁻¹. As soluções foram gotejadas em pastilhas de KBr e deixadas sob vácuo para secagem controlada e posterior análises. As caracterizações morfológicas foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo JEOL JSM IT300LV e com um Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo JEOL JEM2100 LaB₆ - 200 kV. A solução do bionanoconjugado AuNp-PEG-Tri foi gotejada em grades específicas para microscopia. Esse porta amostra contendo o bionanoconjugado foi colocado em dessecador durante 48 horas e depois utilizado para obtenção das imagens de MET.

2.4. Simulações realizadas no site Protein Date Bank (PDB)

Utilizando o site (*Protein Date Bank - PDB*) e o código da enzima tripsina 1S0Q, é possível obter inúmeras informações da enzima tripsina e de outras biomoléculas a partir das ferramentas *on-line* do software. Todos os parâmetros teóricos da enzima tripsina-1S0Q foram extraídos das simulações realizadas neste *software* de fácil uso e livre acesso e que contempla várias ferramentas de simulação.

3. Resultados e Discussão

3.1. Espectroscopia UV-Vis da enzima tripsina

Segundo a simulação computacional realizada no site *Protein Data Bank* (PDB) a enzima tripsina (1S0Q) apresenta formato globular, como visto na Figura 1a. Espectroscopicamente, o comportamento na região do UV-Vis da enzima tripsina pura foi analisado na região entre 225 a 450 nm, conforme observado no espectro da Figura 1b. Nota-se nitidamente a presença de uma banda de baixa intensidade com máximo de absorção em 280 nm. Essa banda é atribuída à absorção de energia por parte dos cromóforos presentes nas estruturas químicas dos aminoácidos fenilalanina (Figura 1c) e triptofano (Figura 1d), além do da tirosina.^{19,20} Esses aminoácidos fazem parte da estrutura dos inúmeros resíduos de aminoácidos (Figura 1e) que compõem a estrutura secundária da tripsina, conforme visto na simulação computacional realizada no site PDB.

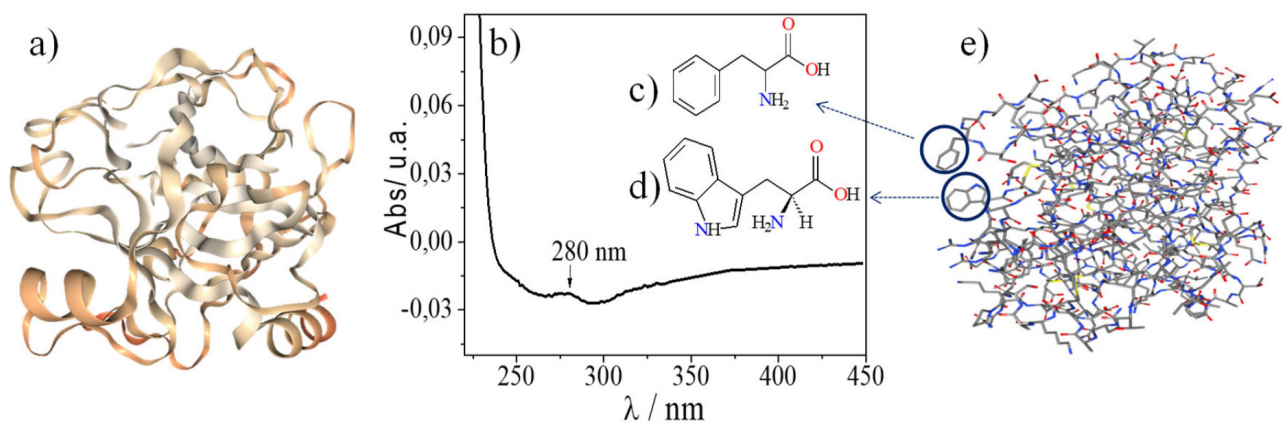


Figura 1. (a) Representação esquemática da estrutura terciária da enzima tripsina: 1S0Q-PDB. (b) Espectro UV-Vis para a enzima tripsina. Estruturas químicas dos aminoácidos (c) fenilalanina e (d) triptofano. (e) Representação esquemática da estrutura secundária com os resíduos de aminoácidos em destaque da tripsina

3.2. Espectroscopia UV-Vis da NpAu-PEG-Tri

A síntese das nanopartículas de ouro bioconjugadas à tripsina foi realizada por redução química dos íons Au^{3+} para Au^0 utilizando o NaBH_4 como agente redutor e a enzima tripsina como agente estabilizante na presença do PEG. Conforme detalhado na parte experimental, a solução do sal de ouro passou de amarelo claro para a cor rosa, indicando a presença de ouro com dimensões nanométricas, como pode ser visto na Figura 2a.²¹ A Figura 2b apresenta o comportamento espectroscópico para a tripsina (linha preta), a solução de HAuCl_4 (linha azul) e a suspensão contendo o bioconjugado NpAu-PEG-Tri (linha vermelha). Para o espectro do sal de ouro, nota-se a presença de uma banda com máximo de absorção em 314 nm, atribuída às transições eletrônicas entre o ligante cloro e o metal ouro.²² Para o espectro do bioconjugado, observa-se claramente uma banda em 524 nm, típico da ressonância plasmônica de superfície de nanopartículas de ouro. Considerando a teoria de Mie, aqui o eixo da absorbância máxima é equivalente ao coeficiente de extinção máximo (α_{ext}).^{23,24} Esse coeficiente é

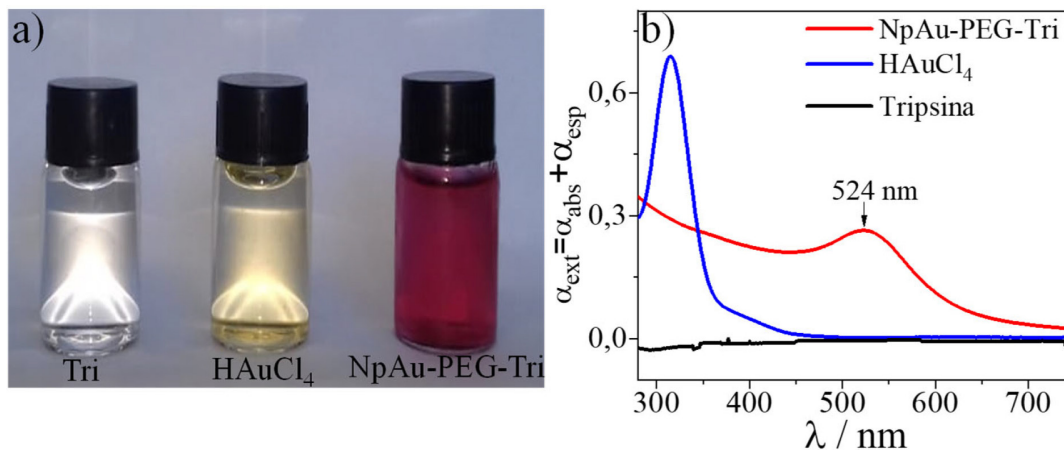


Figura 2. (a) Fotografia das soluções de tripsina, sal de ouro e do bioconjugado NpAu-PEG-Tri. (b) Espectros UV-Vis para a enzima tripsina (linha preta), sal de ouro (linha azul) e do bioconjugado NpAu-PEG-Tri (linha vermelha)

a resultante da soma da contribuição da radiação absorvida (a_{abs}) e da radiação espalhada (a_{esp}), ocasionado pela interação da luz com materiais com igual ou menor valor do comprimento de onda da radiação eletromagnética.

3.3. Espectroscopia na região do infravermelho para o NpAu-PEG-Tri

Com o propósito de investigar como ocorre a interação no bioconjugado NpAu-PEG-Tri, realizou-se a análise por meio da espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A Figura 3 apresenta os três espectros para tripsina (a), PEG (b) e NpAu-PEG-Tri (c) e os seus principais modos vibracionais encontram-se sumarizados na Tabela 1.

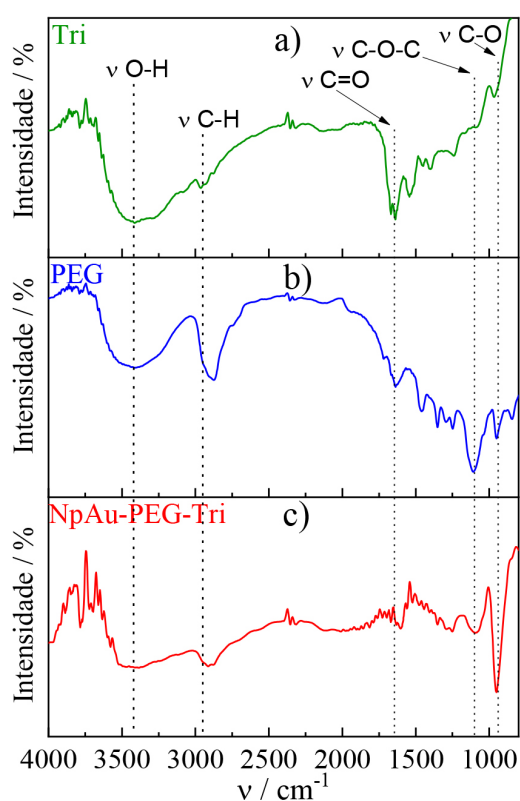


Figura 3. Espectros de FTIR para Tripsina (a), PEG (b) e bioconjugado NpAu-PEG-Tri (c)

Tabela 1. Principais bandas observadas nos espectros de FTIR

Modo de vibração (em cm^{-1})	Tripsina	PEG	NpAu-PEG-Tri
ν (N-H)	3260	----	3227
δ (N-H)	1543	----	----
δ (C-N-H)	1398	----	----
ν (C=O)	1635	----	1591
ν (C-O-C)	1088	1110	1093
ν (C-O)	971	949	949
ν (C-H)	2970	2875	2908
ν (O-H)	3420	3398	3410

Por meio dos espectros é possível notar que houve interações entre as nanopartículas o PEG e a tripsina, devido aos deslocamentos observados nos principais modos vibracionais da tripsina. Especificamente, as duas principais bandas características do PEG ocorrem em 3400 cm^{-1} , associada ao estiramento assimétrico da ligação; e o estiramento assimétrico, na região de 1110 cm^{-1} .²⁵ No espectro do sistema bioconjugado esses modos vibracionais sofreram deslocamentos (3415 e 1093 cm^{-1} , respectivamente). A banda referente ao estiramento diminui de intensidade, sugerindo que o polímero pode interagir por meio deste grupo. Em relação à enzima tripsina pura, a banda referente a modo de vibração de estiramento ocorre na região de 1635 cm^{-1} (amida I).²⁶ Por outro lado, essa banda no sistema bionanoconjugado aparece deslocada para região de menor energia (1591 cm^{-1}). Tais deslocamentos são indicativos de mudanças estruturais na enzima e no polímero, e que sugerem uma interação destes com a superfície das nanopartículas de natureza apenas eletrostática.²⁷

É importante destacar que a permanência dos modos vibracionais da enzima no bioconjugado sugere que não houve degradação das estruturas primária e secundária da enzima quando submetida ao processo de síntese das nanopartículas. Isso demonstra que a obtenção das nanopartículas de ouro pode ser realizada em uma só etapa na presença da tripsina. Com isso, acredita-se que os cátions Au^{3+} , que inicialmente encontram-se na superfície da enzima tripsina neste processo de síntese, sofrem redução para Au^0 , seguido do crescimento do diâmetro da nanopartícula. A formação, portanto, do bionanoconjugado pode ser idealizada no esquema representado da Figura 4.

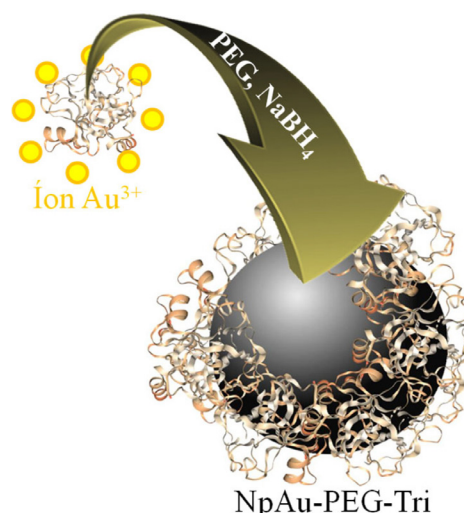


Figura 4. Representação esquemática do processo de formação das nanopartículas na presença da enzima tripsina

3.4. Caracterização morfológica do NpAu-PEG-Tri

A análise morfológica do bioconjugado NpAu-PEG-Tri foi realizada utilizando-se a Microscopia Eletrônica de

Transmissão (MET). A Figura 5a-c mostra três imagens de MET com diferentes magnificações. As nanopartículas apresentam-se polidispersas, conforme visto na Figura 5a. É nítido nas imagens das Figuras 5b e 5c que as nanopartículas de ouro conjugadas ao PEG e a enzima tripsina apresentam geometria esférica sem a ocorrência de agregados e com boa dispersividade. Características similares também foram encontradas por Nidhin e co-autores para nanopartículas de ouro conjugadas com a mesma enzima.²⁸ A partir da contagem de 150 nanopartículas, conforme visto no histograma da Figura 5d construído pelo *software* Origin®, o diâmetro médio das nanopartículas foi de 5 nm. Ao realizar um aumento em uma região específica da imagem da Figura 5c, observa-se nitidamente uma espécie de revestimento esbranquiçado na maioria das nanopartículas, sinalizados pelas setas vermelhas na imagem da Figura 5e. Este revestimento é atribuído à presença das enzimas, que devem estar adsorvidas na superfície das nanopartículas por meio de interações eletrostáticas. Neste sentido, é possível propor uma representação esquemática deste processo de bioconjugação entre a superfície da nanopartícula e a enzima tripsina, como pode ser visto na Figura 5f.

Quando a síntese é realizada nas mesmas condições, porém sem a presença do PEG, as nanopartículas tendem a formar enormes aglomerados, conforme visualizado na imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura da Figura 6a. Tal efeito também foi visto por Lv e colaboradores, no qual a enzima tende a proporcionar a junção de mais nanopartículas, ocasionando

em agregados.²² Outro fato que merece destaque no nanobioconjugado sem o PEG é a presença da banda plasmônica de superfície que aparece na região do espectro UV-Vis em 545 nm, indicando maior tamanho de partícula (Figura 6b). Isso demonstra que é fundamental a presença do PEG para promover o controle fino da estabilização e crescimento das nanopartículas.

3.5. Estudo da estabilidade do bioconjugado NpAu-PEG-Tri

O estudo da estabilidade foi realizado para obter a informação do tempo em que o bioconjugado NpAu-PEG-Tri se mantém estável em solução. Dessa forma, as análises foram realizadas com intervalo de 48 horas durante 30 dias, conforme visto nos espectros UV-Vis da Figura 7a. Nessa figura, nota-se que não há diminuição e nem deslocamento significativos na absorção máxima das bandas em 524 nm. Esse comportamento fica mais evidente quando se constrói um gráfico que correlaciona o comprimento de onda (λ) em função dos dias, como pode ser visto na Figura 7b, representado pelas esferas pretas. Além disso, quando se correlaciona o coeficiente de extinção (a_{ext}) máximo em função do tempo, também é nítido que não há variação significativa do coeficiente de extinção, como pode ser visto no gráfico representado pelas esferas vermelhas. Durante esse processo de varredura da mesma suspensão do sistema NpAu-PEG-Tri, o bioconjugado foi mantido em temperatura de 4 °C. Esses resultados indicam que o sistema se mantém com boa estabilidade durante esse período de tempo estudado.

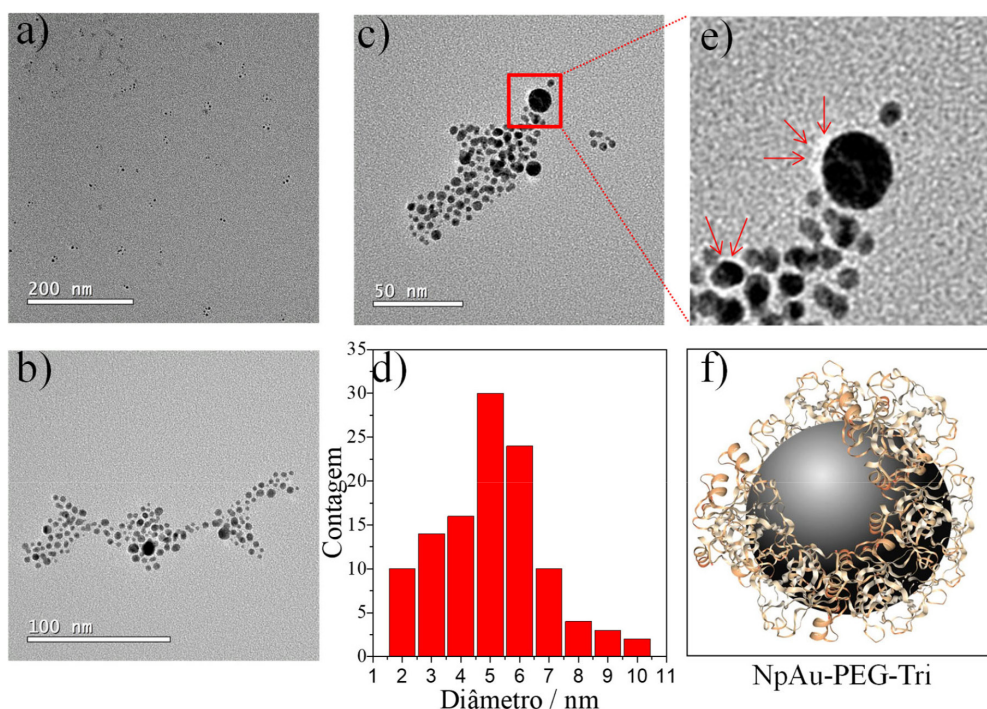


Figura 5. Imagens de MET das NpAu-PEG-Tri (a - c) com diferentes magnificações de aumento. Histograma da distribuição do tamanho médio das Nps (d). Aumento destacando a presença do revestimento da enzima tripsina ao redor das nanopartículas de ouro (e). Representação esquemática do processo de interação entre a nanopartícula e a enzima tripsina (f).

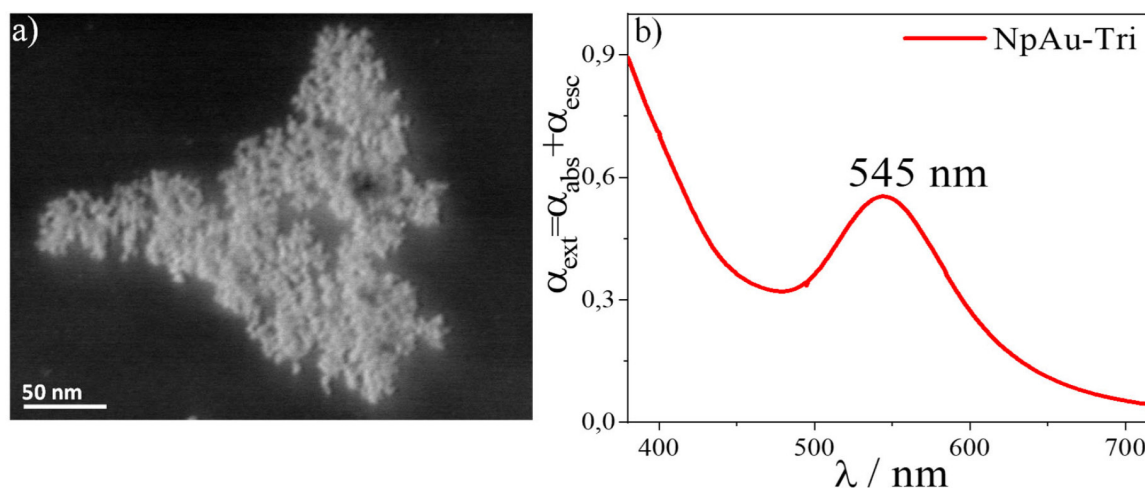


Figura 6. Imagens de MEV do bioconjugado NpAu-Tri (a). Espectro UV-Vis para o bioconjugado NpAu-Tri (b)

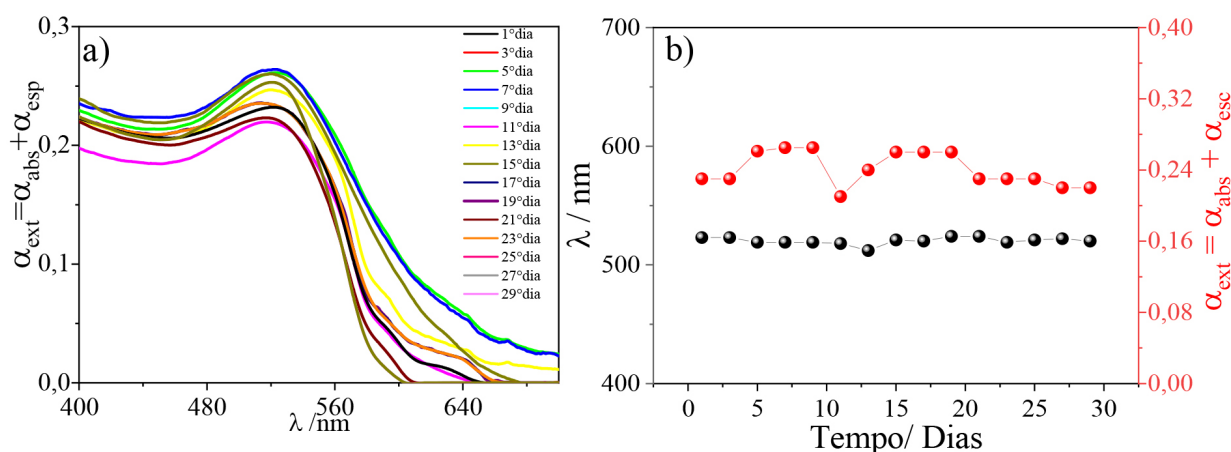


Figura 7. (a) Espectros de absorção na região do UV-vis para estudo de estabilidade do bioconjugado NpAu-PEG-Tri. (b) gráfico com três eixos: comprimento de onda versus tempo (esferas pretas) e coeficiente de extinção versus tempo (esferas vermelhas)

4. Conclusão

A utilização da enzima tripsina na síntese garantiu, junto ao polietilenoglicol, o controle do crescimento das nanopartículas de ouro com diâmetro médio de 5 nm. Além disso, os resultados espectroscópicos e morfológicos mostraram que a enzima se mantém, diante da síntese, intacta e estável do ponto de vista de estrutura química. Esses resultados possibilitam o avanço dos estudos para aplicar o bionanoconjugado NpAu-PEG-Tri em reações específicas com o respectivo substrato da enzima tripsina.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelas bolsas de mestrado concedidas, ao Programa de Pós-Graduação em Química – UFCAT, aos Professores Frank Nelson Crespillo e Alberthmeiry Teixeira de Figueiredo pela utilização dos equipamentos de caracterização das

amostras e ao apoio financeiro do IFGOIANO/PROPPI-Resolução nº 064/2014.

Referências Bibliográficas

- Zhao, P.; Li, N.; Astruc, D.; State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews* **2013**, 257, 638. [\[Crossref\]](#)
- Alizadeh, S.; Nazari, Z.; A Review on Gold Nanoparticles Aggregation and Its Applications. *Journal of Chemical Reviews* **2020**, 2, 228. [\[Crossref\]](#)
- Cai, Z.; Liu, Y. J.; Leong, E. S. P.; Teng, J.; Lu, X.; Highly ordered and gap controllable two-dimensional nonclose-packed colloidal crystals and plasmonic photonic crystals with enhanced optical transmission. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22, 24668. [\[Crossref\]](#)
- Yaqoob, S. B.; Adnan R.; Khan, R. M. R.; Rashid, M.; Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications. *Frontiers in Chemistry* **2020**, 8, 376. [\[Crossref\]](#)

5. Nejati, K.; Dadashpour, M.; Gharibi, T.; Mellatyar, H.; Akbarzadeh, A.; Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. *Journal of Cluster Science* **2021**, *33*, 1. [[Crossref](#)]
6. Wang, W.; Wang, J.; Ding, Y. Gold nanoparticle-conjugated nanomedicine: design, construction, and structure-efficacy relationship studies. *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, *22*, 1. [[Crossref](#)]
7. Bromma, K.; Chithrani, D. B.; Advances in Gold Nanoparticle-Based Combined Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1671. [[Crossref](#)]
8. Siddique, S.; Chow, J. C. L.; Gold Nanoparticles for Drug Delivery and Cancer Therapy. *Applied Sciences* **2020**, *10*, 3824. [[Crossref](#)]
9. Khlebtsov, N.; Dykman, L.; Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 1647. [[Crossref](#)]
10. Willner, I.; Basnar, B.; Willner, B. Nanoparticle-enzyme hybrid systems for nanobiotechnology. *The FEBS Journal* **2007**, *274*, 302. [[Crossref](#)]
11. Liu, S.; Lammerhofer, M.; Functionalized gold nanoparticles for sample preparation: a review. *Electrophoresis* **2019**, *40*, 2438. [[Crossref](#)]
12. Chen, M.; Zeng, G.; Xu, P.; Lai, C.; Tang, L.; How Do Enzymes 'Meet' Nanoparticles and Nanomaterials? *Trends in Biochemical Sciences* **2017**, *42*, 914. [[Crossref](#)]
13. Kozłowski, R. B.; Ragupathi, A.; Dyer, R. B.; Characterizing the Surface Coverage of Protein-Gold Nanoparticle Bioconjugates. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29*, 2691. [[Crossref](#)]
14. Lv, M.; Zhu, E.; Su, Y.; Li, Q.; Li, W.; Zhao, Y.; Huang, Q.; Trypsin-Gold Nanoparticle Conjugates: Binding, Enzymatic Activity, and Stability. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **2009**, *39*, 429. [[Crossref](#)]
15. Rahme, K.; Chen, L.; Hobbs, R. G.; Morris, M. A.; O'driscoll, C.; Holmes, J. D.; PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. *RSC Advances* **2013**, *3*, 6085. [[Crossref](#)]
16. Ahmad, R.; Sardar, M.; Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* **2015**, *4*, 1. [[Crossref](#)]
17. Kaur, J.; Singh, P. K.; Trypsin detection strategies: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2020**, *50*, 1. [[Crossref](#)]
18. Salar, S.; Mehrnejad, F.; Sajedi, R. H.; Arough, J. M.; Chitosan nanoparticles-trypsin interactions: Bio-physicochemical and molecular dynamics simulation studies. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *103*, 902. [[Crossref](#)]
19. Chanphai, P.; Kreplak, L.; Tajmir-Riahi, H. A. Aggregation of trypsin and trypsin inhibitor by Al cation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2017**, *169*, 7. [[Crossref](#)]
20. Fan, Y.; Dong, X.; Yan, L.; Li, D.; Hua, S.; Hu, C.; Pan, C.; Evaluation of the toxicity of ionic liquids on trypsin: a mechanism study. *Chemosphere* **2016**, *148*, 241. [[Crossref](#)]
21. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I.; Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *12*, 908. [[Crossref](#)]
22. Lv, H.; Xu, D.; Henzie, J.; Feng, J.; Lopes, A.; Yamauchi, Y.; Liu, B.; Mesoporous gold nanosphere via thiolate-Au(I) intermediates. *Chemical Science* **2019**, *10*, 6423. [[Crossref](#)]
23. Duque, J. S.; Blandón, J. S.; Riascos, H.; Localized Plasmon resonance in metal nanoparticles using Mie theory. *Journal of Physics: Conferences Series* **2017**, *850*, 012017. [[Crossref](#)]
24. Mahmoud, M. A.; El-Sayed, M. A.; Gold Nanoframes: Very High Surface Plasmon Fields and Excellent Near-Infrared Sensors. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 12704. [[Crossref](#)]
25. Niu, L.; Luo, Y.; Li, Z.; A highly selective chemical gas sensor based on functionalization of multi-walled carbon nanotubes with poly(ethylene glycol). *Sensors and Actuators B* **2007**, *126*, 361. [[Crossref](#)]
26. Qin, D.; Yang, G.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Zhang, L.; Green synthesis of biocompatible trypsinconjugated Ag nanocomposite with antibacterial activity. *Applied Surface Science* **2019**, *469*, 528. [[Crossref](#)]
27. Wang, Z.; Ma, L.; Gold nanoparticle probes. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 1607. [[Crossref](#)]
28. Nidhin, M.; Ghosh, D.; Yadav, H.; Yadav, N.; Majumder, S.; Structural and functional aspects of trypsin-gold nanoparticle interactions: An experimental investigation. *Materials Science and Engineering B*, **2015**, *202*, 46. [[Crossref](#)]