

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS
E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

Desenvolvimento de estratégias de funcionalização em nanopartículas de ouro para aumentar a sensibilidade de testes para diagnósticos virais

Cristina Chies Bianco

Caxias do Sul, 2019

Cristina Chies Bianco

Desenvolvimento de estratégias de funcionalização em nanopartículas de ouro para aumentar a sensibilidade de testes para diagnósticos virais

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos, orientado pela Prof^ª. Dr^ª. Mariana Roesch Ely.

Caxias do Sul, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

B578d Bianco, Cristina Chies

Desenvolvimento de estratégias de funcionalização em nanopartículas de ouro para aumentar a sensibilidade de testes para diagnósticos virais / Cristina Chies Bianco. – 2019.

103 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2019.

Orientação: Mariana Roesch Ely.

1. Nanotecnologia. 2. Materiais nanoestruturados. 3. Nanopartículas.
4. Ouro. 5. Testes imunológicos. I. Ely, Mariana Roesch, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 620.3

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o) Ana
Guimarães Pereira - CRB 10/1460

Desenvolvimento de estratégias de funcionalização em nanopartículas de ouro para aumentar a sensibilidade de testes para diagnósticos virais

Cristina Chies Bianco

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais

Caxias do Sul, 03 de abril de 2019

Orientadores:

Profa. Dra. Mariana Roesch Ely
Orientadora
Universidade de Caxias do Sul

Banca examinadora:

Prof. Dr. Diego Piazza
Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Jacqueline Ferreira Leite
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Giovanela
Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos, que não entendem o que eu faço, mas me apoiam em todos os momentos. Obrigada pelo incentivo.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a. Mariana Roesch Ely pela orientação, acompanhamento e apoio, sem os quais o desenvolvimento desta dissertação não teria sido possível.

À toda a equipe do Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA, em especial, à minha colega de projeto Caroline Menti pelos ensinamentos e auxílio nas etapas experimentais.

À Universidade de Caxias do Sul, ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul por disponibilizarem a infraestrutura de seus laboratórios e equipamentos.

À CAPES pelos recursos providos para o desenvolvimento do projeto.

À todas as pessoas não citadas que contribuíram de alguma forma para que essa dissertação tomasse forma. Nessa vida nada se faz sozinho. Obrigada!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO GERAL	17
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	NANOTECNOLOGIA E NANOMATERIAIS	19
3.2	NANOTECNOLOGIA PARA FINS DIAGNÓSTICOS	20
3.2.1	Dispositivos de diagnóstico: dispositivos de fluxo lateral	21
3.2.2	Dispositivos de diagnóstico: biossensores	24
3.2.2.1	Biossensores magnetoelásticos	25
3.3	NANOPARTÍCULAS	27
3.3.1	Nanopartículas de ouro	28
3.4	ESTRATÉGIA DE FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO: MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZÁVEIS	32
3.4.1	Polietilenoglicol heterobifuncional	34
3.4.1.1	Avaliação da adsorção de grupos sulfidrílicos pelas nanopartículas de ouro: método colorimétrico	37
3.4.1.2	Avaliação da adsorção de grupos sulfidrílicos pelas nanopartículas de ouro: método cromatográfico	38
3.4.2	Anticorpos	38
3.4.3	Horseradish peroxidase (HRP)	41
3.4.3.1	Método para avaliação da captura da enzima HRP	41
3.5	APLICAÇÕES DE ESTRATÉGIAS DE FUNCIONALIZAÇÃO EM TESTE DE DIAGNÓSTICO VIRAIS	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	MATERIAIS	46
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	46
4.2.1	Espectroscopia de absorção molecular na região do visível	46
4.2.2	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV/FEG)	47
4.2.3	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	47
4.2.4	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	48

4.2.5	Potencial zeta (PZ)	48
4.3	METODOLOGIA	48
4.3.1	Estabilização das nanopartículas de ouro	49
4.3.2	Quantificação de grupos sulfidrílicos em solução	53
4.3.2.1	Método colorimétrico	53
4.3.2.2	Metódo cromatográfico	54
4.3.3	Cinéticas de adsorção e modelagens matemáticas	56
4.4	ESTRATÉGIAS DE FUNCIONALIZAÇÃO	56
4.4.1	Captura da enzima HRP para as diferentes estratégias de funcionalização ..	58
4.4.2	Estabilidade e aplicação das estratégias de funcionalização em teste de diagnóstico viral	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	62
5.2	ESTABILIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ..	64
5.2.1	Uso de polietilenoglicol amino terminal para a modificação das superfícies das nanopartículas em solução	64
5.3	USO DE POLIETILENOGLICOL HETEROFUNCIONAL PARA A MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	72
5.3.1	Cinéticas de adsorção para as soluções coloidais de AuNPs modificadas com polietilenoglicol heterobifuncional	72
5.3.2	Modelos matemáticos	75
5.3.3	Modificação das superfícies com as concentrações ótimas de polietilenoglicol heterobifuncional	77
5.4	AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE FUNCIONALIZAÇÃO	82
5.4.1	Avaliação da eficiência de captura das diferentes estratégias de funcionalização	88
5.4.2	Aplicações de estratégias de funcionalização em teste de diagnóstico virais ..	91
6	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nanomedicamentos aprovados pela <i>Food and Drug Administration</i> (FDA), a partir de 2002, para comercialização (adaptado de DIMER <i>et al.</i> , 2013 e ETHERIDGE <i>et al.</i> , 2013).....	22
Tabela 2. Características e aplicações de diferentes metais e materiais semicondutores empregados em nanopartículas (adaptado de DE; GHOSH; ROTELLO, 2008).....	28
Tabela 3. Comparação entre diferentes agentes estabilizantes relatados na literatura (adaptado de https://nanohybrids.net/pages/what-is-the-difference-between-citrate-ctab-peg-silica-coatings . Acessado em abr. 2018.).....	33
Tabela 4. Programação de eluição desenvolvida por Schott (2005).....	55
Tabela 5. Programação de eluição adaptada para a presente dissertação.	55
Tabela 6. Informações fornecidas pela Sigma-Aldrich para cada uma das soluções coloidais de AuNPs (Disponível em: < https://www.sigmaaldrich.com > Acessado em jan. 2019.).....	63
Tabela 7. Relação entre número de partículas/mL e concentração de PEG-NH ₂ 5000 utilizada na etapa 1 (adaptado de LING; JIANG; ZHANG, 2013).	65
Tabela 8. Diâmetros médios para as soluções coloidais de AuNPs antes e após a estabilização realizada durante a primeira etapa.	65
Tabela 9. Relação entre as áreas superficiais das nanopartículas que compõem as soluções coloidais e as proporções entre os volumes das soluções de nanopartículas e PEG-NH ₂ 5000 (adaptado de LING; JIANG; ZHANG, 2013).	66
Tabela 10. Relação entre valores de potencial zeta e grau de agregação do coloide (adaptado de Lu, Kessler (2006).....	70
Tabela 11. Diâmetros médios das soluções coloidais de AuNPs obtidos na segunda etapa.	71
Tabela 12. Potencial zeta das soluções coloidais de AuNPs obtidas na segunda etapa	71
Tabela 13. Concentrações adsorvidas de HS-PEG-NH ₂ 3500 e HS-PEG-NH ₂ 7500 pelas AuNPs estimadas por meio dos dois métodos de quantificação de grupos sulfidrílicos	74
Tabela 14. Diâmetros médios e potenciais zeta medidos para as soluções coloidais de AuNPs estabilizadas com HS-PEG-NH ₂ 3500 g/mol.....	78
Tabela 15. Diâmetros médios e potenciais zeta medidos para as soluções coloidais de AuNPs estabilizadas com HS-PEG-NH ₂ 7500 g/mol.....	78
Tabela 16. Diâmetros médios para as soluções coloidais de AuNPs obtidos na etapa 4	86
Tabela 17. Potencial zeta das soluções coloidais de AuNPs obtidas na etapa 4	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Levantamento do número de artigos na base de dados *Web of Science* utilizando o termo ‘*Nanotechnology*’ no período entre 1995-2018..... 19
- Figura 2.** Representação esquemática do princípio de funcionamento de um dispositivo de fluxo lateral (adaptado de CORDEIRO *et al.*, 2016)..... 23
- Figura 3.** Esquema comparativo de testes de fluxo lateral. (a) Teste com detecção direta e (b) teste com detecção indireta (adaptado de WONG; TSE, 2009). 24
- Figura 4.** Representação esquemática do princípio de detecção dos biossensores magnetoelásticos antes e após o carregamento de massa a partir do uso de amplificadores de massa (adaptado de KOSAKA, 2014) 26
- Figura 5.** Representação esquemática (A) do mecanismo de interação entre nanopartículas e imunossensor funcionalizado, (B) do dispositivo prototipado com sensores funcionalizados com anticorpos Anti-ZikaV proteína SN1 e AntiZikaV proteína do envelope viral. 27
- Figura 6.** Levantamento do número de artigos na base de dados *Web of Science* utilizando o termo “*gold nanoparticles*” 29
- Figura 7.** Representação esquemática da formação dos momentos dipolares em nanopartículas de ouro (CORDEIRO *et al.*, 2016)..... 30
- Figura 8.** Representação esquemática da estabilização de partículas pelo efeito (a) eletrostático e (b) estérico. (adaptado de MARANGONI, 2012)..... 31
- Figura 9.** Representação esquemática da cinética de formação das monocamadas auto-organizáveis (SAM): (a) etapa inicial caracterizada pela rápida adsorção e crescimento da espessura do filme, seguida por um processo lento (b) de adsorção e organização, até a formação final (c) da monocamada auto-organizável (adaptado de CANCINO, 2008)..... 32
- Figura 10.** Representação esquemática da monocamada auto-organizável de polietilenoglicol sobre a superfície da nanopartícula de ouro (adaptado de CANCINO, 2008)..... 35
- Figura 11.** Relação entre o número de ligantes estimado através de análise termogravimétrica (TGA) em função da massa molar do polietilenoglicol (adaptado de RAHME *et al.*, 2013). 35
- Figura 12.** Conformações das cadeias de polietilenoglicol na superfície das nanopartículas de ouro nas configurações de (A) escova e (B) cogumelo (adaptado de JOKERST *et al.*, 2011). 36
- Figura 13.** Reação de redução do ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB²⁻) (adaptado ELLMAN *et al.*, 1961)..... 37
- Figura 14.** Representação esquemática da estrutura e dos domínios de um anticorpo. O grupo carboxílico na porção do domínio constante (Fc) ligado a um polímero funcionalizado sobre a nanopartícula (esquerda) e o grupamento amino livre na porção do domínio de ligação com o antígeno (Fab) para reconhecer o antígeno (direita) (adaptado de MANDAL, 2014). 39
- Figura 15.** Representação entre anticorpos monoclonais e policlonais juntamente com as

	possibilidades de interação entre os epítomos do antígeno de interesse (adaptado de KELLY, 2007).	40
Figura 16.	Exemplo das etapas de funcionalização e conjugação dos elementos de reconhecimento na superfície de uma nanopartícula de ouro devido à interação entre o grupo carboxílico presente no domínio constante do anticorpo ligado ao polímero funcionalizado (adaptado de MASEREEL <i>et al.</i> , 2010).....	40
Figura 17.	Princípio da reação de oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) empregada para a medição indireta da captura da enzima HRP para as quatro estratégias de funcionalização (adaptado de PAROLO <i>et al.</i> , 2013).....	42
Figura 18.	Grupo ferroprotoporfirina IX (“grupo heme”), sítio ativo da enzima horseradish peroxidase (VEITCH, 2004).	42
Figura 19.	Fluxograma do procedimento experimental utilizado na estabilização e funcionalização das nanopartículas de ouro, a captura da horseradish peroxidase e implementação das estratégias de funcionalização nos kits de diagnóstico virais.	49
Figura 20.	Representação esquemática da metodologia empregada na primeira etapa da estabilização das soluções de nanopartículas de ouro com PEG-NH ₂ 5000 g/mol.....	50
Figura 21.	Representação esquemática da metodologia empregada na etapa 2 da estabilização das soluções de nanopartículas de ouro com PEG-NH ₂ 5000 g/mol.....	51
Figura 22.	Representação esquemática da metodologia empregada na terceira etapa da estabilização das soluções de nanopartículas de ouro com HS-PEG-NH ₂ 3500 e 7500 g/mol	52
Figura 23.	Representação esquemática da metodologia empregada no método colorimétrico para a quantificação de grupos sulfidrílicos adsorvidos pelas nanopartículas de ouro estabilizadas com HS-PEG-NH ₂ 3500 e 7500 g/mol	53
Figura 24.	Representação esquemática da metodologia empregada no método cromatográfico para a quantificação de grupos sulfidrílicos adsorvidos pelas nanopartículas de ouro estabilizadas com HS-PEG-NH ₂ 3500 e 7500 g/mol	55
Figura 25.	Representação esquemática das etapas realizadas para as estratégias de funcionalização das soluções de nanopartículas de ouro. A) Estratégias I e II; B) Estratégias III e IV.....	57
Figura 26.	Representação esquemática da metodologia realizada para a avaliação da captura da enzima horseradish peroxidase pelas nanopartículas de ouro funcionalizadas pelas quatro diferentes estratégias de funcionalização.	59
Figura 27.	Representação esquemática da metodologia empregada para a aplicação das diferentes estratégias de funcionalização das nanopartículas de ouro nos testes de diagnóstico viral.....	60
Figura 28.	Esquematisação das etapas empregadas para a estabilização e funcionalização	

das nanopartículas de ouro, a captura da horseradish peroxidase e implementação das estratégias de funcionalização nos kits de diagnóstico virais.	62
Figura 29. Espectros de absorção e imagens de MEV-FEG das soluções coloidais de nanopartículas de ouro de A) 20 nm, B) 40 nm, C) 80 nm.....	64
Figura 30. Estabilidade óptica medida para as soluções com nanopartículas de 20 nm (A), 40 nm (B) e 80 nm (C) em diferentes meios dispersantes.	67
Figura 31. Nanopartículas de 20 nm: A) controle, B) tempo 12 h, C) tempo 24 h; Modificadas com PEG-NH ₂ 5000 g/mol, D) tempo 12 h, E) tempo 24 h... 68	68
Figura 32. Nanopartículas de 40 nm, A) controle, B) tempo 12 h, C) tempo 24 h; Modificadas com PEG-NH ₂ 5000 g/mol, D) tempo 12 h, E) tempo 24 h... 69	69
Figura 33. Nanopartículas de 80 nm, A) controle, B) tempo 12 h, C) tempo 24 h; Modificadas com PEG-NH ₂ 5000 g/mol, D) tempo 12 h, E) tempo 24 h... 69	69
Figura 34. Cinéticas de adsorção para as partículas de 20 nm com HS-PEG-NH ₂ 3500 g/mol (A) e HS-PEG-NH ₂ 7500 g/mol (B).....	72
Figura 35. Cinéticas de adsorção para as partículas de 40 nm (A e B), onde: A) ■ 40 nm, HS-PEG-NH ₂ 3500 g/mol, 2 h; B) ■ 40 nm, HS-PEG-NH ₂ 7500 g/mol, 2 h.	73
Figura 36. Cinéticas de adsorção para as partículas de 80 nm (A e B), onde: A) ■ 80 nm, HS-PEG-NH ₂ 3500 g/mol, 2 h; B) ■ 80 nm, HS-PEG-NH ₂ 7500 g/mol, 2 h.	73
Figura 37. Modelo matemático para as nanopartículas de 20 nm. (A), 40 nm (B) e 80 nm (C).....	77
Figura 38. Imagens de MEV/FEG, (A) 20 nm com PEG 3500, t=12 h; (B) t=24 h; (C) 20 nm com PEG 7500, t=12 h (D) t=24 h; (E) 40 nm com PEG 3500, t=12 h; (F) t=24 h; (G) 40 nm com PEG 7500, t=12 h (H) t=24 h; (I) 80 nm com PEG 3500, t=12 h; (J) t=24 h; (K) 80 nm com PEG 7500, t=12 h (L) t=24 h.....	79
Figura 39. Imagens de MET, (A) Padrão 20 nm; (B) 20 nm com PEG 3500; (B) 20 nm com PEG 7500; (D) Padrão 40 nm; (E) 40 nm com PEG 3500; (F) 40 nm com PEG 7500; (F) Padrão 80 nm; (G) 80 nm com PEG 3500; (H) 80 nm com PEG 7500.....	80
Figura 40. Representação esquemática das estratégias empregadas, (A) estratégias I e II e (B) estratégias III e IV. Concentrações de enzima capturada para cada uma das estratégias de funcionalização nos tempos de 2h (C) e 12h (D) para as nanopartículas de 40 nm e nos tempos de 2h (E) e 12h (F) para as nanopartículas de 80 nm.	83
Figura 41. Concentrações de polietilenoglicol heterobifuncional adsorvida para cada uma das estratégias nos tempos de 2 h (A); 12 h (B) para nanopartículas de 40 nm e nos tempos de 2 h (C); 12 h (D) para as nanopartículas de 80 nm.	85
Figura 42. Solução de nanopartículas de ouro de 40 nm após a modificação com a estratégia I nos aumentos de 20000 vezes (A), 50000 vezes (B) e 100000 vezes (C) e modificadas com a estratégia II nos aumentos de 20000 vezes (D), 50000 vezes (E) e 100000 vezes (F).....	87
Figura 43. Solução de nanopartículas de 80 nm após a modificação com a estratégia II	

nos aumentos de 10000 vezes (A), 20000 vezes (B) e 50000 vezes (C). Padrão funcionalizado (75 nm) Nanopartz nos aumentos de 10000 vezes (D), 20000 vezes (E) e 50000 vezes (F)..... 88

Figura 44. Concentrações da enzima horseradish peroxidase adsorvidas pelas quatro estratégias de funcionalização em diferentes meses para as nanopartículas de 40 nm. Estratégia I (A), estratégia II (B), estratégia III (C) e estratégia IV (D). 89

Figura 45. Concentrações da enzima horseradish peroxidase adsorvidas pelas a quatro estratégias de funcionalização em diferentes meses para as nanopartículas de 80 nm. Estratégia I (A), estratégia II (B), estratégia III (C) e estratégia IV (D). 90

Figura 46. Representação da amplificação proporcionada pelas nanopartículas em testes ELISA (A) e resultados comparativos entre os testes controle (padrão do kit, sem nanopartículas) e com nanopartículas de 40 nm frente a estratégia II para detecção de (B) HCV e (C) HIV..... 91

RESUMO

A multifuncionalidade das nanopartículas de ouro (AuNPs) têm sido destaque em várias áreas do conhecimento nas últimas décadas, incluindo diagnósticos, onde fatores como a dispersão e a estabilidade estão diretamente relacionados ao desempenho dos testes, e por isso o estudo de distintas estratégias de funcionalização é essencial. A estabilização das nanopartículas pode ser conduzida através de adsorção de polímeros em suas superfícies, conferindo as características e propriedades às nanopartículas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estabilizar e funcionalizar nanopartículas de ouro de diferentes dimensões (20, 40 e 80 nm). Cinéticas de adsorção e modelos matemáticos possibilitaram a determinação das concentrações ótimas das variedades de polímeros heterobifuncionais empregadas. Entretanto, uma vez que a elaboração da equação que previsse o comportamento das nanopartículas de 20 nm não foi possível, para as etapas seguintes este tamanho de nanopartícula foi descartado. A enzima horseradish peroxidase (HRP) foi empregada como uma alternativa para aferir a eficiência das diferentes estratégias. Para isso foram realizados testes que avaliaram a dispersão, a captura da enzima e a estabilidade a partir das técnicas de espectroscopia de absorção na região do UV e visível, microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV/FEG), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta. Nanopartículas de ouro de 40 e 80 nm foram modificadas com soluções de polietilenoglicol heterofuncional (HS-PEG-NH₂ 3500 e 7500 g/mol) submetidas a quatro diferentes estratégias de funcionalização (I e III com HS-PEG-NH₂ 3500; II e IV com HS-PEG-NH₂ 7500). Nas estratégias I e II, as soluções poliméricas foram colocadas em contato com a solução de anticorpos anti-HRP, seguida pela adição das soluções coloidais, enquanto que nas estratégias III e IV as soluções coloidais entraram primeiramente em contato com as soluções poliméricas e em seguida conjugadas aos anticorpos. Soluções com concentrações de 30, 50, 100 e 200 ng/mL de HRP foram adicionadas às soluções resultantes. Foi observado um rendimento e eficácia superior das estratégias I e II quando comparadas às estratégias III e IV, uma vez que as primeiras apresentaram capacidade de captura de até 5 vezes quando estabilizadas durante 2 h e de até 6 vezes durante 12 h. A redução dos diâmetros médios das nanopartículas para essas estratégias foi evidente quando comparados aos medidos para as soluções padrão. Além disso, o aumento dos valores de potencial zeta para os sistemas anticorpo/PEG/nanopartículas indica que houve a interação entre as soluções contendo anticorpo/PEG e as nanopartículas. Em relação a estabilidade, mesmo com a redução na capacidade de captura da enzima, a estratégia que se mostrou mais promissora quando levados em consideração os fatores dispersão das partículas, captura da HRP e estabilidade durante os diferentes meses de ensaio, foi a estratégia II para as nanopartículas de 40 e 80 nm. Após testes iniciais com captura da HRP, procederam-se experimentos utilizando kits de diagnóstico virais (Bioclin Biolisa HCV e HIV) a fim de verificar se haveria aumento de sensibilidade com a implementação das nanopartículas. A estratégia II foi avaliada para nanopartículas de 40 nm e os resultados demonstraram a capacidade desta de detectar a presença do antígeno em diluições 1000 vezes inferiores a resposta positiva apresentada pelo kit. Além disso, o kit de HIV foi capaz de intensificar a respostas obtidas em aproximadamente 50%. A utilização de nanopartículas funcionalizadas em testes de análise de captura e de imunodiagnóstico para mostrou-se uma excelente estratégia para o incremento de sensibilidade do sistema.

Palavras-chave: nanopartículas de ouro, estratégias de funcionalização, polietilenoglicol heterobifuncional, hepatite C, HIV.

ABSTRACT

Gold nanoparticle (AuNPs) functionality has been highlighted in several areas of knowledge in recent decades, including diagnostics, where factors such as dispersion and stability are directly related to the test performance, the study of different functionalization strategies is essential. The stabilization of the nanoparticles can be conducted through polymers adsorption in their surfaces, conferring the characteristics and properties of nanoparticles. In this context, the objective of this work was to stabilize and functionalize gold nanoparticles of different dimensions (20, 40 and 80 nm). Adsorption kinetics and mathematical models allowed the determination of optimal concentrations of the heterobifunctional polymer varieties employed. However, since the preparation of the equation that predicted the nanoparticle behavior of 20 nm was not possible, for the following steps this nanoparticle size was discarded. The enzyme horseradish peroxidase (HRP) was used as an alternative to gauge the efficiency of the different strategies. Initially the enzyme horseradish peroxidase (HRP) was employed as an alternative to gauge the efficiency of different strategies. Tests that evaluated the dispersion, the capture of the enzyme and the of the stability strategies by techniques as spectroscopy in the UV and visible region, scanning electron microscopy (SEM), dynamic light scattering (DLS) and zeta potential were conducted. 40 and 80 nm gold nanoparticles were modified with heterofunctional polyethylene glycol solutions (HS-PEG-NH₂ 3500 and 7500 g/mol) and subjected to four different functionalisation strategies (I and III with HS-PEG-NH₂ 3500, II and IV with HS-PEG-NH₂ 7500). In strategies I and II, the polymeric solutions were placed in contact with the solution of anti-HRP antibodies, followed by addition of the colloidal solutions. While in strategies III and IV, the colloidal solutions first come into contact with the polymer solutions and then conjugated to the antibodies. Solutions with concentrations of 30, 50, 100 and 200 ng / ml HRP were added to the resulting solutions. A superior yield and efficacy of strategies I and II were observed when compared to strategies III and IV, since the former had a capture capacity of up to 5 times when stabilized for 2 h and up to 6 times for 12 h. The reduction of the average diameter of the nanoparticles to these strategies was evident when compared with those measured for the standard solutions. Furthermore, the increase of the zeta potential values for the antibody/ PEG/ nanoparticle systems, indicates that a interaction between the antibody/PEG solutions and the nanoparticles was established. Regarding stability, even considering reduction in the enzyme capture capability, strategy II presented best dispersion of particles, capture of HRP and stability during different months of the trial for both nanoparticles of 40 and 80 nm. After initial HRP capture, experiments were performed using viral diagnostic kits (Bioclin Biolisa HCV and HIV) to verify if there was gain in sensitivity with the implementation of the nanoparticles. The strategy II was evaluated for 40 nm nanoparticles and the results demonstrated the ability to detect the presence of the antigen at 1000-fold lower than the positive response presented by the kit. In addition, the HIV kit was able to intensify the responses obtained in approximately 50%. The use of functionalized nanoparticles in capture and immunodiagnostic analysis tests proved to be an excellent strategy for increasing the sensitivity of the system

Keywords: gold nanoparticles, functionalization strategies, heterobifunctional polyethylene glycol, hepatitis C, HIV.

1 INTRODUÇÃO

O uso das nanopartículas tem proporcionado o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento, os quais já vêm sendo empregados, para uma variedade de doenças na área da nanomedicina. As áreas de biossensoriamento, de produção e armazenagem de energia e, principalmente da medicina, saúde e diagnóstico, foram as mais impactadas pelo emprego das nanopartículas de ouro (AuNPs) nos últimos 10 anos.

Globalmente, cerca de 36,9 milhões e 71 milhões de pessoas viviam com AIDS (HIV) e Hepatite C (HCV) no final de 2017, destas cerca de 2,3 milhões possuíam ambas as doenças. Ainda segundo a Organização Mundial de Saúde (2019), aproximadamente 1,3 milhões de mortes foram ocasionadas por ambas as doenças no mesmo período.

Uma vez que as estratégias de combate a ambas as doenças dependem de medicações recém-desenvolvidas acopladas a métodos de diagnóstico relativamente caros que exigem mão de obra e equipamentos especializados, uma das principais aplicações das nanopartículas de ouro está em sua implementação em dispositivos portáteis e de respostas rápidas para o diagnóstico de ambas as doenças que acometem a população mundial.

As propriedades ópticas únicas das nanopartículas de ouro como a ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR), é responsável por atribuir cores intensas às suspensões e, conseqüentemente, agregar sensibilidade aos dispositivos de diagnóstico rápido. Entretanto, ainda devido a esta propriedade, as nanopartículas apresentam tendência natural de se agregar. Assim, a modificação da superfície, a partir do uso de estabilizantes, é imprescindível para manter a estabilidade e a funcionalidade das soluções coloidais.

Visando minimizar os efeitos de aglomeração das nanopartículas de ouro, diferentes estratégias de funcionalização podem ser empregadas, sendo uma delas conduzida através de compostos multifuncionais, ou seja, com grupamentos funcionais em sua estrutura, como por exemplo, metilas, aminos, carboxilas, carbonilas, hidroxilas e ainda sulfidrilas. As sulfidrilas, em particular, são alternativas bastante interessantes, uma vez que as ligações do tipo sulfeto são fortes e ocorrem de forma espontânea com o ouro.

Geralmente, para a estabilização das nanopartículas de ouro são empregados os

chamados alcanotióis, entretanto, variados agentes estabilizantes podem ser empregados, destacando o citrato de sódio quando mantido em excesso na solução coloidal, o polietilenoglicol (PEG), o tampão fosfato de sódio, o cloreto de sódio e a água ultrapura.

O atrativo dessa abordagem é a possibilidade de controlar a estabilidade das soluções coloidais, conferindo as características e propriedades dos compostos às nanopartículas modificadas. Além disso, alia-se a essa técnica o uso de anticorpos, os quais agregam especificidade ao processo de modificação das superfícies das nanopartículas de ouro.

O projeto de pesquisa em que esta dissertação está inserida é intitulado “Imunossensor magneto-elástico para diagnóstico de Zika vírus”. Trata-se de uma cooperação entre a Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul e instituições como a Universidade de Caxias do Sul e o Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas que visa o desenvolvimento de um método de diagnóstico alternativo capaz de detectar antígenos do Zika vírus e a presença de imunoglobulinas no soro.

Frente ao exposto, no presente trabalho, propõe-se avaliar variados estabilizantes, capturar antígenos de interesse, como a enzima horseradish peroxidase, a partir de diferentes estratégias de funcionalização, bem como avaliar a estabilidade dessas em função do tempo de armazenamento. Além disso, propõe-se a utilização de nanopartículas funcionalizadas para aumentar a sensibilidade de captura antigênica em testes comerciais baseados na detecção qualitativa de anticorpos para o vírus da da AIDS e da hepatite C.

2 OBJETIVO GERAL

Estabilizar e funcionalizar nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos (20, 40 e 80 nm), visando a captura da enzima horseradish peroxidase e antígenos virais de hepatite C e AIDS para aumentar a sensibilidade de testes para diagnósticos virais por meio de quatro estratégias de funcionalização distintas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as soluções de nanopartículas de ouro de 20, 40 e 80 nm através das técnicas de espectroscopia de absorção molecular na região do UV e visível, microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta.
- Avaliar a estabilidade das soluções de nanopartículas de ouro estabilizadas com polietilenoglicol amino terminal 5000 g/mol (1000 µg/mL) durante 12 h e mantidas em meios dispersantes compostos por água ultrapura, tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,4), citrato de sódio (38,8 mmol/L) e cloreto de sódio (0,05 mmol/L) durante os tempos de 0; 2,5; 5,5; 8,5; 12; 24 e 48 h de contato.
- Padronizar métodos colorimétricos e cromatográficos capazes de quantificar grupos sulfidrílicos em solução, a fim de possibilitar a medição indireta das concentrações de polietilenoglicol heterobifuncional (HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol) adsorvidas pelas nanopartículas.
- Desenvolver cinéticas das concentrações adsorvidas de HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol para as soluções de 20, 40 e 80 nm nos tempos de 2 e 12 h de estabilização, através dos métodos colorimétricos e cromatográficos padronizados.
- Elaborar modelos matemáticos, através das cinéticas observadas, que relacionem as concentrações iniciais de HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol, as concentrações adsorvidas pelas nanopartículas de ouro e a massa molar da cadeia de polietilenoglicol heterobifuncional.

- Estabilizar as soluções de 20, 40 e 80 nm com as concentrações ótimas de HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol e caracterizá-las por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, microscopia eletrônica de transmissão, espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta.
- Avaliar a dispersão das partículas e a captura da enzima horseradish peroxidase para as diferentes estratégias de funcionalização através das técnicas de espectroscopia de absorção molecular na região do UV e visível, cromatografia líquida de alta eficiência, espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta e microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo.
- Avaliar a eficiência das estratégias de funcionalização através da comparação entre as concentrações de enzima capturada durante 0, 2, 3 4 e 7 meses para a solução de nanopartículas de 40 nm e durante 0, 2, 3 e 6 meses para a solução de nanopartículas de 80 nm.
- Avaliar o desempenho da presença de nanopartículas de ouro funcionalizadas quanto à sensibilidade na captura de antígenos virais presentes em kit comerciais de diagnóstico de hepatite C e HIV.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMATERIAIS

A definição utilizada para descrever Nanotecnologia conceitua o conjunto de tecnologias, técnicas e processos para a posterior preparação, caracterização, manipulação de átomos ou moléculas para construir novos materiais em escala nanométrica (10^{-9} m = 1 nm) (ALENCAR; BOCHNER; DIAS, 2013).

O estudo de materiais cujos tamanhos de partículas que os constituem encontram-se na faixa de nanômetros tem sido apontado como uma das áreas de grande potencial para atender os Objetivos do Milênio das Organizações das Nações Unidas (ONU), fator que vêm contribuindo para o aumento de publicações sobre o tema. A Figura 1 apresenta o levantamento do número de artigos na base de dados *Web of Science* utilizando o termo *Nanotechnonology* entre os anos de 1995 e 2018.

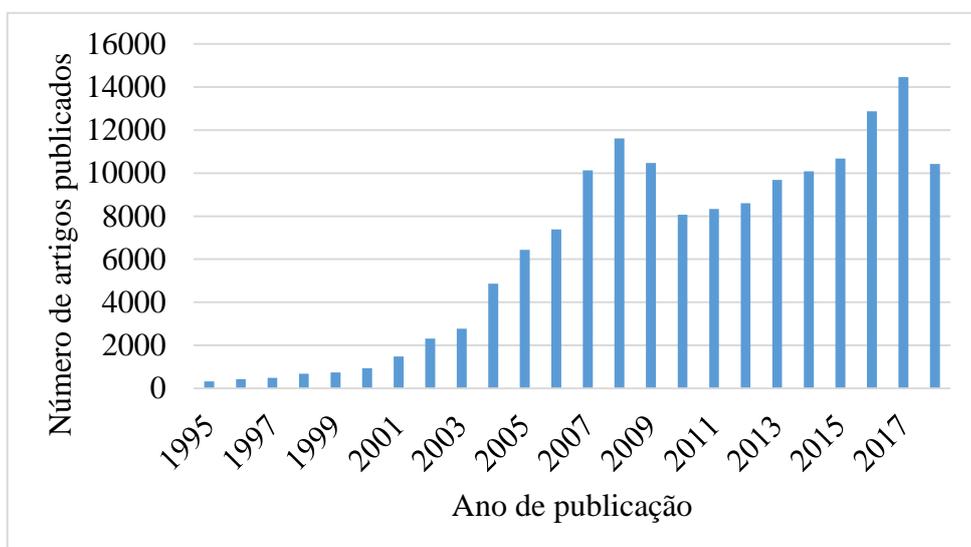


Figura 1. Levantamento do número de artigos na base de dados *Web of Science* utilizando o termo '*Nanotechnology*' no período entre 1995-2018

Uma vez que a nanotecnologia vem sendo empregada em diferentes áreas, Salamanca-Buentello *et al.* (2005) mapearam as principais aplicações e a forma com que esta poderia vir a contribuir com os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio propostos pela ONU no ano 2000. Dentre os destacados encontram-se: a detecção de pestes e vetores, o tratamento de águas, o processamento de alimentos, a armazenagem e produção

de energia e o mapeamento e diagnóstico de doenças, sendo este último, o segundo setor mais impactado pela Nanotecnologia no Brasil, ficando atrás apenas do setor de materiais eletrônicos e de comunicação (ABDI, 2010).

3.2 NANOTECNOLOGIA PARA FINS DIAGNÓSTICOS

A aplicação da Nanotecnologia aos cuidados de saúde - também conhecida como Nanomedicina - requer a intersecção de diversificadas áreas do conhecimento, incluindo Biologia, Química, Física, Engenharia, Ciência dos Materiais e Medicina Clínica. Esse campo está atualmente em fase de desenvolvimento, mas já oferece potenciais aplicações em produtos farmacêuticos, sistemas de imagem e diagnóstico, tratamento de câncer, materiais implantáveis, regeneração de tecidos e até mesmo em plataformas multifuncionais combinando vários desses modos de ação (FAROKHZAD; LANGER, 2006; BOISSEAU; LOUBATON, 2011; ETHERIDGE *et al.*, 2013).

Embora já se empregue a Nanomedicina para diagnóstico, monitorização e tratamento de patologias como sífilis e hepatite, além do direcionamento de drogas (*drug delivery*) e a miniaturização de sistemas de entrega de fármacos, no futuro espera-se que a sua utilização seja destinada a todas as vertentes dos cuidados de saúde, possibilitando o aumento da qualidade de vida da população (FAROKHZAD; LANGER, 2006; BOISSEAU; LOUBATON, 2011; SILVA, 2014; SVENSON, 2014).

Além disso, a partir do seu uso, visa-se a obtenção de diagnósticos mais eficazes, a redução das doses terapêuticas, uma maior segurança e sobrevida em cirurgias complexas, além de contribuir para o desenvolvimento de nanomedicamentos e dispositivos de diagnósticos com altíssima precisão e sem efeitos invasivos ao corpo humano (BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

Características como a biodegradabilidade, a biocompatibilidade, a capacidade de funcionalização superficial, a conjugação, complexação e o encapsulamento são essenciais para a seleção e a obtenção das formulações empregadas nos nanomedicamentos (DIMER *et al.*, 2013).

Além disso, estes podem ser encapsulados através de diferentes mecanismos, como, por exemplo, solubilização ou retenção na nanopartícula, conjugação ou adsorção. Em uma situação ideal as nanopartículas - atuando como nanocarreadores - são capazes de transportar o fármaco para o local específico de destino para exercer a sua atividade

terapêutica com o máximo de segurança.

Os principais nanocarreadores aplicados em nanomedicamentos são os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as micelas e as nanopartículas poliméricas. (ETHERIDGE *et al.*, 2013). Alguns dos nanomedicamentos aprovados para comercialização, a partir de 2002, nos Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) são apresentados na Tabela 1.

3.2.1 Dispositivos de diagnóstico: dispositivos de fluxo lateral

Os dispositivos de fluxo lateral ou *lateral flow devices* (LFA) são equipamentos portáteis capazes de transferir fluidos biológicos como sangue ou soro através de sua ação capilar, sem requerer uma fonte de alimentação externa. Dentre suas principais vantagens estão o fácil manuseio, o tempo de resposta rápido, o baixo custo, a especificidade aceitável e a vida útil prolongada, sem a necessidade de refrigeração. Um estudo de 2010 revelou que os LFAs representavam 50% e 40% do mercado global de testes rápidos nos Estados Unidos e na Europa, respectivamente (O'FARRELL, 2013; RIVAS *et al.*, 2014).

Apesar dos LFAs fornecerem resultados confiáveis com sensibilidade aceitável, a falta de robustez e reprodutibilidade são as principais desvantagens destes dispositivos. A incorporação de nanopartículas, em especial as de ouro, agregam sensibilidade ao sistema. Outra alternativa para acrescentar robustez ao sistema é a utilização de substratos flexíveis, como algodão, uma vez que este é de fácil manuseio e requer uma quantidade menor de amostra (HU *et al.*, 2013; SUN; XIANYU; JIANG, 2014).

O imunoenensaio de fluxo lateral mais famoso é o teste de gravidez; no entanto, já existem testes rápidos para sífilis, HIV, giárdia, dengue, hepatite, entre outros. Entretanto, várias áreas do mercado têm interesse em adquirir este modelo de teste, dentre elas: ambiental, veterinária e a de saúde, visando principalmente o diagnóstico de doenças (WONG; TSE, 2009).

Tabela 1. Nanomedicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), a partir de 2002, para comercialização (adaptado de DIMER *et al.*, 2013 e ETHERIDGE *et al.*, 2013).

Tipo de nanoestrutura	Nome Comercial	Fármaco	Via de administração	Empresa	Indicação
Conjugado fármaco-albumina	Abraxane/Taxol	Paclitaxel	i.v.	Abraxis, BioScience e Astrazeneca	Câncer de mama
Conjugado fármaco-proteína	Somavert	Pegvisomanto	s.c.	Nektar e Pfizer	Acromegalia
Conjugado proteína-polímero	Pegasys	Peginterferon alfa-2 ^a recombinante	s.c.	Nektar e Hoffmann-La Roche	Hepatite B e C
Conjugado proteína-polímero	Pegasys	Peginterferon alfa-2 ^a recombinante	s.c.	Nektar e Hoffmann-La Roche	Hepatite B e C
Conjugado proteína-polímero	Neeulasta	Pegfilgrastin	s.c.	Amgen	Neutropenia
Lipossomas	Visudyne	Verteporfin	i.v.	QLT e Novartis	Degeneração macular senil
Nanocristal	Ritalin LA	Metilfenidato	Oral	Novartis	Estimulante do Sistema Nervoso Central
Nanocristal	Triglide	Fenofibrato	Oral	SkyePharma e First Horizon	Desordens lipídicas (colesterol e triglicerídeos)
Nanocristal	Triglide	Fenofibrato	Oral	SkyePharma e First Horizon	Desordens lipídicas (colesterol e triglicerídeos)
Nanopartícula de fosfato	Elestrin	Estradiol	Transdérmica	BioSanté	Sintomas da menopausa
Nanopartículas magnéticas	Ferumoxytol	Suplemente de Ferro	i.v.	Amag Pharmaceutics	Anemia
Nanopartícula polimérica	Cimzia	Certolizumabe pegol	i.m.	Enzon	Artrite reumatóide e doença de Crohn
Microemulsão	Durezol	Difluprednate	Tópico	Sirion Therapeutics	Anti-inflamatório oftálmico

Onde: i.v: via intravenosa; s.c: via subcutânea; i.m: via intramuscular.

O princípio de funcionamento dos LFAs baseia-se na interação entre o antígeno de interesse e o biorreceptor imobilizado à superfície. Inicialmente, a amostra contendo o antígeno migra por capilaridade para a região onde o primeiro elemento de reconhecimento (anticorpo) está conjugado às nanopartículas de ouro. Na sequência, o complexo resultante migra para a região de teste através de uma membrana de nitrocelulose hidrofóbica ou acetato de celulose. Nesta etapa ocorre a imobilização do complexo, devido à presença de um segundo elemento de reconhecimento presente na região de teste. Já na área tida como controle, o segundo elemento de reconhecimento é responsável por imobilizar o primeiro e não o complexo de interesse, possibilitando o diagnóstico. Uma representação do princípio de funcionamento destes dispositivos pode ser observada na Figura 2 (RIVAS *et al.*, 2014; SUN; XIANYU; JIANG, 2014; CORDEIRO *et al.*, 2016).

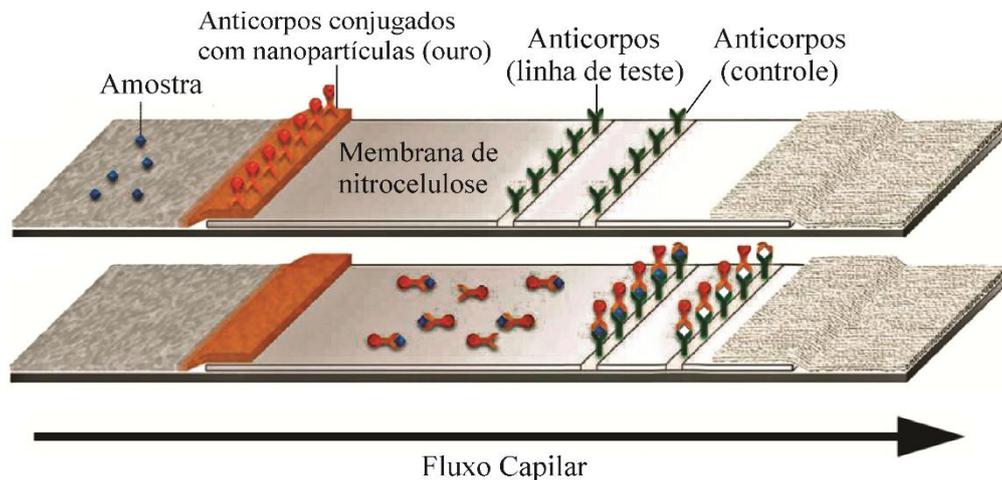


Figura 2. Representação esquemática do princípio de funcionamento de um dispositivo de fluxo lateral (adaptado de CORDEIRO *et al.*, 2016)

Estes dispositivos podem apresentar dois tipos de respostas baseados no procedimento de detecção do antígeno: a detecção indireta e a detecção direta. Na forma de detecção direta, o resultado positivo resulta em duas linhas coloridas (a teste e a controle), enquanto que na forma indireta, o resultado positivo resulta em apenas uma linha (o controle), pois a presença do antígeno na amostra ocupa os sítios presentes na linha de teste, impedindo que o conjugado se ligue como exemplificado na Figura 3 A e B.

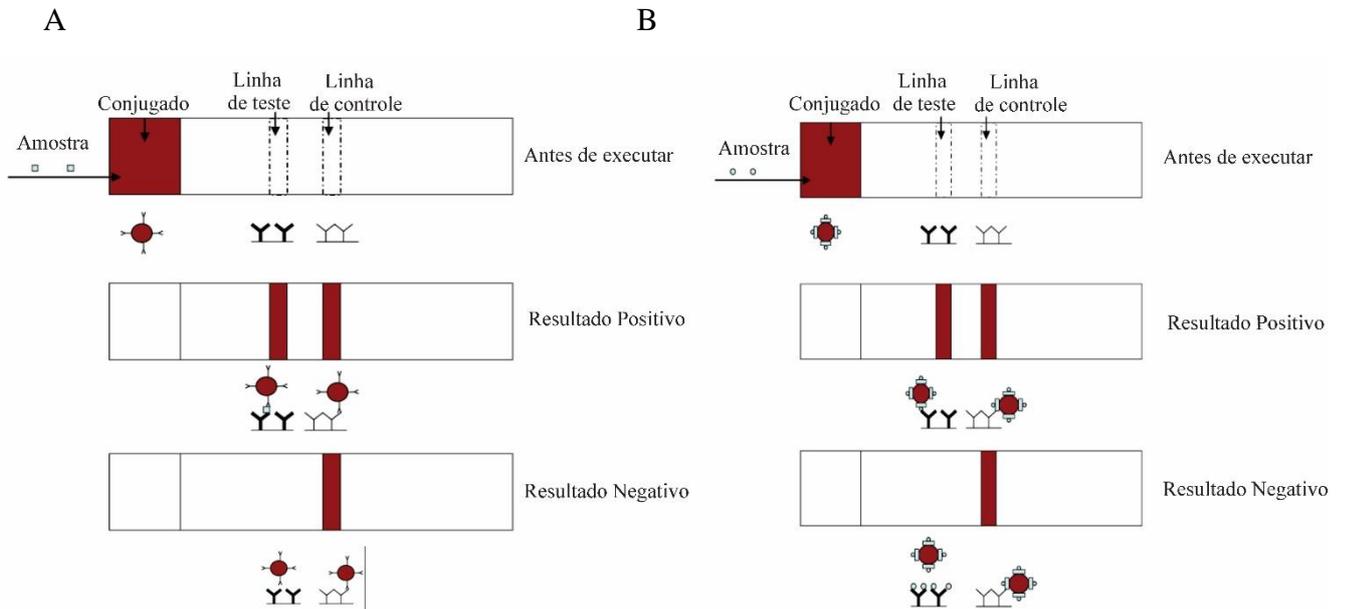


Figura 3. Esquema comparativo de testes de fluxo lateral. (a) Teste com detecção direta e (b) teste com detecção indireta (adaptado de WONG; TSE, 2009).

3.2.2 Dispositivos de diagnóstico: biossensores

Um biossensor é um dispositivo que integra um elemento de reconhecimento biológico, como enzimas, anticorpos, DNA ou micro-organismos, com um transdutor de sinal (TURNER *et al.*, 1989; NAKAMURA; KARUBE, 2003; WANEKAYA; CHEN; MULCHANDANI, 2008; BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

Dentre as principais vantagens do uso deste tipo de dispositivo estão a facilidade de uso, a portabilidade, o fornecimento de respostas rápidas e específicas, além da alta sensibilidade. Frente a essas características, são utilizados em aplicações de monitoramento ambiental, detecção de micro-organismos na indústria alimentícia, e em áreas clínicas e de diagnósticos (WANEKAYA; CHEN; MULCHANDANI, 2008; LAWAL; ADELOJU, 2012).

Apesar do interesse no assunto de biossensores e de uma grande variedade de dispositivos ter sido desenvolvida nas últimas três décadas, ainda existe a necessidade de desenvolvimento de uma tecnologia com a capacidade de identificar de maneira rápida e precisa uma ampla quantidade de contaminantes, uma vez que o diagnóstico e detecção destes é um problema mundial. Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul (UCS) já vem trabalhando com a detecção de bactérias, leveduras e, mais recentemente, vírus, em especial o vírus da Zika

(ZKV) (POSSAN., 2015; BELTRAMI, 2016; MENTI, 2016; POZZA, 2016). Dessa forma, destaca-se no tópico seguinte os biossensores magnetoelásticos, tipo de biossensor empregado no projeto de pesquisa em que esta dissertação está inserida.

3.2.2.1 Biossensores magnetoelásticos

Os biossensores magnetoelásticos são comumente encontrados em supermercados na forma de marcadores antifurto, podendo ser empregados também para a quantificação de agentes como glicose, endotoxinas e micro-organismos, quando os dispositivos são modificados com finas camadas quimicamente sensíveis, como cistamina (GRIMES *et al.*, 2011; POSSAN *et al.*, 2016; MENTI *et al.*, 2016, MENTI *et al.*, 2017).

O princípio de funcionamento destes é baseado no efeito magnetostrictivo e magnetoelástico do material amorfo. A excitação de ondas longitudinais no sensor é promovida pela aplicação de um campo magnético externo oscilante, proveniente de uma bobina de excitação. A frequência de resposta emitida pelo sensor é captada e mensurada por meio de uma bobina de captação (*pick-up coil*) conectada a um analisador de rede, equipamento no qual o sinal é captado e ilustrado na forma de picos de ressonância (GRIMES *et al.*, 2002; SHEN *et al.*, 2009).

Já o princípio de detecção destes dispositivos está relacionado com um carregamento de massa aplicado sobre a superfície destes. Essa sobreposição dificulta a formação de ondas oscilantes no sensor e, conseqüentemente, promove a redução da frequência de ressonância característica do sensor, possibilitando a quantificação do agente de interesse (GRIMES *et al.*, 2002).

Entretanto, ao utilizar estes biossensores em aplicações que visam a detecção de macromoléculas como toxinas e proteínas ou organismos como bactérias e vírus, os quais podem vir a pesar entre alguns milhares de Dalton ($1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g}$) até 10^{-12} g no caso de vírus e bactérias, há a necessidade de implementar amplificadores de massa ao sistema. Dentre os comumente empregados destaca-se o uso das nanopartículas de ouro. Uma representação esquemática do princípio de detecção deste tipo de biossensor, antes e após o carregamento de massa, juntamente com o uso de amplificadores de massa, pode ser observado na Figura 4. É possível observar que a frequência de ressonância do sensor diminui com o incremento de massa, uma vez que é adicionado nanopartículas ao sistema.

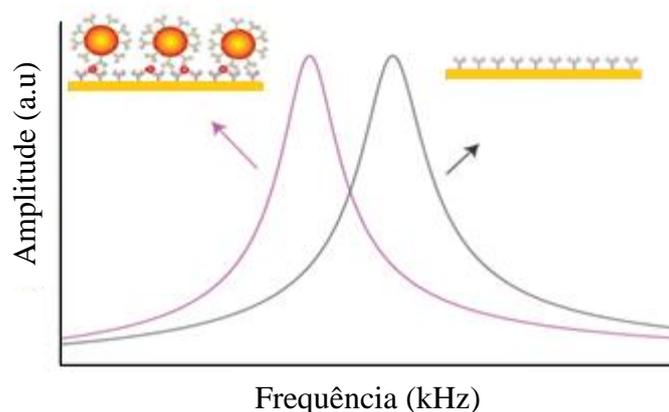


Figura 4. Representação esquemática do princípio de detecção dos biossensores magnetoelásticos antes e após o carregamento de massa a partir do uso de amplificadores de massa (adaptado de KOSAKA, 2014)

Uma representação esquemática dos mecanismos de interação entre nanopartículas e o imunossensor funcionalizado com antígenos e anticorpos em contato com a amostra está apresentada na Figura 5 A, enquanto o dispositivo prototipado, na Figura 5 B. As nanopartículas são adsorvidas ao entrar em contato com os anticorpos e antígenos, amplificando o sistema e transferindo massa ao sensor para que na leitura final seja possível o deslocamento de frequência de ressonância após contato com o analito. O grupo também está desenvolvendo um sistema de leitura multiparamétrica, em que um dispositivo prototipado seja adaptado ao leitor final, a fim de promover a leitura de biossensores em série.

O dispositivo proposto pelo projeto em que esta dissertação está inserida, intitulado “Imunossensor magneto-elástico para diagnóstico de Zika vírus”, baseia-se no uso de um biossensor magnetoelástico associado a nanopartículas para a amplificação do sinal emitido pelo sensor. Este projeto trata-se de uma cooperação entre a Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul e instituições como a Universidade de Caxias do Sul e o Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas que visa o desenvolvimento de um método de diagnóstico alternativo capaz de detectar antígenos do Zika vírus e a presença de imunoglobulinas no soro.

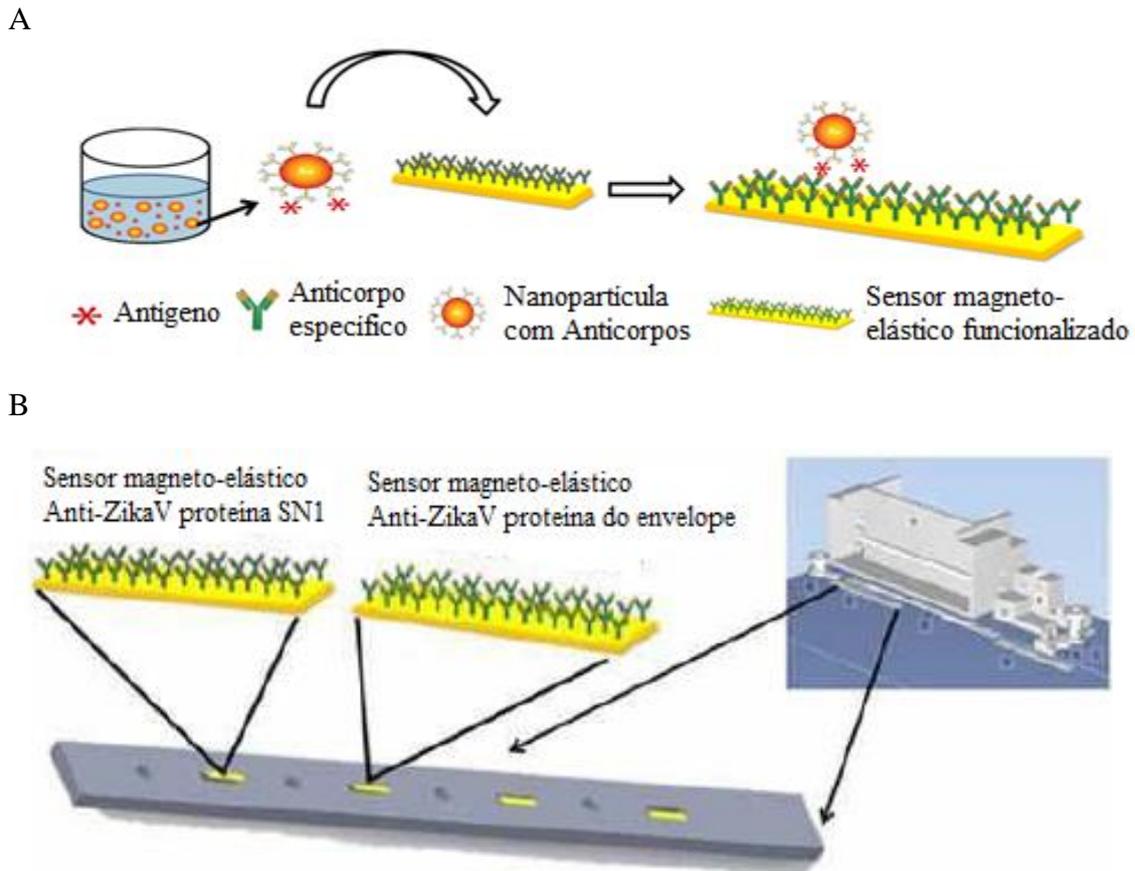


Figura 5. Representação esquemática (A) do mecanismo de interação entre nanopartículas e imunossensor funcionalizado, (B) do dispositivo prototipado com sensores funcionalizados com anticorpos Anti-ZikaV proteína SN1 e AntiZikaV proteína do envelope viral.

3.3 NANOPARTÍCULAS

A aplicabilidade de nanopartículas de metais nobres tem crescido exponencialmente desde o início do século XXI. Esse fator está relacionado com as propriedades ópticas e físicas, as quais são derivadas de uma grande variedade de atributos, como, por exemplo, a similaridade entre o tamanho das nanopartículas e biomoléculas, como proteínas e ácidos polinucleicos (DE; GHOSH; ROTELLO, 2008; POLTE *et al.*, 2010, BURTT; SENANAYAKE, 2016).

Dentre as principais desvantagens do uso das nanopartículas está o fato destas serem termodinamicamente instáveis, principalmente devido a sua alta superfície de contato, e por isso têm tendência natural de crescer e se agregar (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). O fenômeno de agregação pode ocorrer tanto na etapa de síntese quanto posteriormente, fazendo com que a escolha do estabilizante e do meio em que as nanopartículas estarão dispersas sejam fatores essenciais para manter a estabilidade e funcionalidade das soluções coloidais (TOMA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014).

As nanopartículas podem ser produzidas a partir de uma ampla gama de materiais metálicos ou semicondutores, os quais são responsáveis por agregar características como a fluorescência e o comportamento magnético ao sistema. Os principais materiais destacados na literatura, assim como suas características estão apresentadas na Tabela 2 (DE; GHOSH; ROTELLO, 2008).

Tabela 2. Características e aplicações de diferentes metais e materiais semicondutores empregados em nanopartículas (adaptado de DE; GHOSH; ROTELLO, 2008)

Principais materiais	Características	Aplicações
Au (Ouro)	Absorção óptica e supressão de fluorescência, estabilidade	Reconhecimento biomolecular, entrega, sensoriamento
Ag (Prata)	Fluorescência, superfície eficiente	Sensoriamento, detecção de proteínas e antígenos
Pt (Platina)	Propriedade catalítica	Bio-catalisador, sensoriamento
CdSe (Seleneto de cádmio)	Luminescência, fotoestabilidade	Estudo por imagens, sensoriamento
Fe ₂ O ₃ (Óxido de ferro III)	Propriedade magnética	Imagens de ressonância magnética, purificação de biomoléculas
SiO ₂ (Óxido de silício)	Biocompatibilidade	Biocompatível para revestimento de superfícies

Um exemplo de nanopartículas com grande impacto clínico são as nanopartículas de ouro, devido as suas propriedades características, além de deterem ação antimicrobiana.

3.3.1 Nanopartículas de ouro

As AuNPs, através da modificação da sua superfície, podem ser empregadas para a captura de moléculas como a adenosina (ZHENG *et al.*, 2013), biomarcadores como o antígeno prostático específico (PSA) (ULUDAG; TOTHILL, 2012; KOSAKA *et al.*, 2014), toxinas como a aflatoxina B1 (AFB1) (CHAUHAN *et al.*, 2016), macromoléculas como a proteína C-reativa (DING *et al.*, 2014), microorganismos como bactérias (SHEN *et al.*, 2011; ULUDAG; TOTHILL, 2012; SALAM *et al.*, 2013) e vírus (LY; PARK; PARK, 2016; ZHENG *et al.*, 2017).

Além disso, estas nanoestruturas possuem funções em diversas patologias, como na

malária, na SIDA e em neoplasias. Por exemplo, sua utilidade em oncologia, encontra-se relacionada com a capacidade de transporte de fármacos anticancerígenos altamente tóxicos após a modificação da superfície (NAZIR *et al.*, 2014).

A Figura 6 apresenta o levantamento do número de artigos na base de dados *Web of Science* utilizando o termo “*gold nanoparticles*” entre os anos de 1994 e 2018. Dentre os fatores que vêm contribuindo para um aumento substancial de publicações neste tema está o fato destas apresentarem características como núcleos inertes, excelente biocompatibilidade e superfícies versáteis, além do interesse em suas propriedades ópticas (GHOSH *et al.*, 2008, GUO *et al.*, 2012).

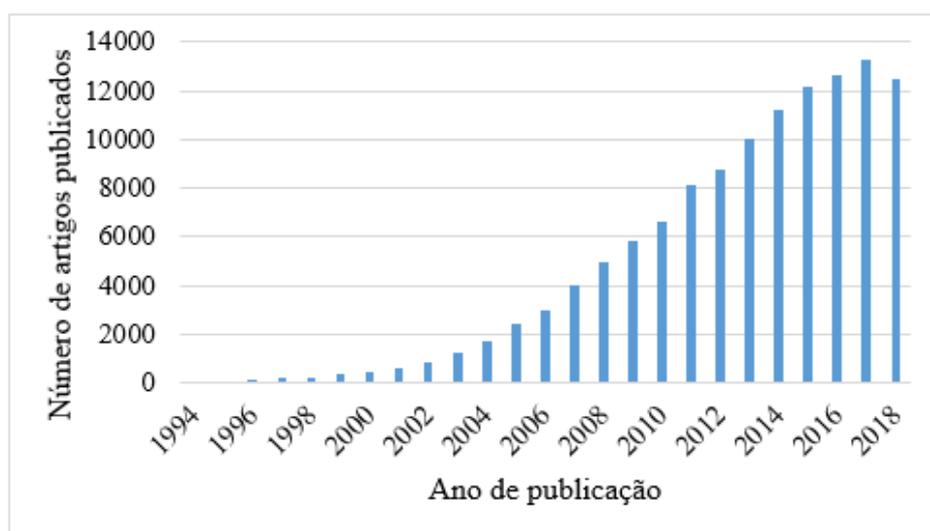


Figura 6. Levantamento do número de artigos na base de dados *Web of Science* utilizando o termo “*gold nanoparticles*”

Uma propriedade óptica muito importante das AuNPs é a ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). Esse efeito pode ser definido como sendo a oscilação dos elétrons entre orbitais vazios em resposta a uma onda eletromagnética incidente. Esta oscilação coletiva gera uma polarização nas nanopartículas, induzindo à formação de momentos dipolares no interior destas, assim como é possível observar na Figura 7 (UECHI; YAMADA, 2010; TOMA *et al.*, 2010; CORDEIRO *et al.*, 2016).

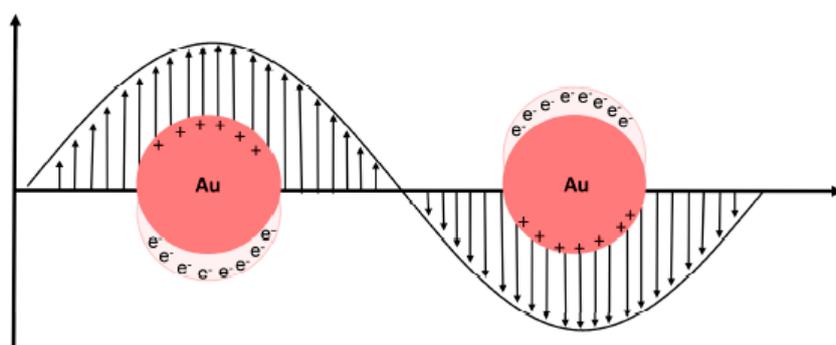


Figura 7. Representação esquemática da formação dos momentos dipolares em nanopartículas de ouro (CORDEIRO *et al.*, 2016)

Esta propriedade é altamente dependente do tamanho, forma, composição, distância entre partículas e arredores dielétricos. Este fenômeno é responsável por atribuir cores distintas às suspensões coloidais de nanopartículas de ouro, as quais podem variar entre tons azulados, avermelhados e alaranjados (GHOSH *et al.*, 2008, GUO *et al.*, 2012; UECHI; YAMADA, 2010; TOMA *et al.*, 2010). Visando o aprimoramento desta característica, diferentes rotas de síntese, meios para a dispersão das partículas e estratégias de funcionalização podem vir a ser empregadas (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951; HERIZCHI *et al.*, 2014).

O processo de síntese das nanopartículas é realizado através da redução química de um sal de ouro, geralmente o ácido tetracloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), na presença de agentes redutores como o borohidreto de sódio, o ácido ascórbico e o citrato de sódio, os quais se ligam à superfície das partículas proporcionando estabilidade, reatividade e propriedades específicas de carga. O citrato de sódio, por exemplo, é utilizado desde 1951 pela capacidade de produzir nanopartículas monodispersas com tamanhos que variam entre 1 e 150 nm (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951; GHOSH *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2013; CARNOVALE *et al.*, 2016).

Embora a redução química de íons metálicos seja o método mais difundido para a síntese de nanopartículas metálicas, muitos desses agentes redutores são tóxicos, de alto custo e, ainda, seus resíduos podem ser incorporados à nanoestrutura, dificultando a caracterização e limitando suas aplicações (ISAEVA, 2013). Além do mais, o controle das variáveis do processo - como pH e temperatura - é considerado crítico para a obtenção de uma dispersão homogênea de tamanho de partícula (GHOSH *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2012; CARNOVALE *et al.*, 2016).

O controle e a distribuição dos tamanhos de nanopartículas de ouro vêm sendo estudados desde 1973, quando Frens adaptou o método desenvolvido por Turkevich em 1951 e

concluiu que estes parâmetros estão diretamente relacionados com a quantidade de citrato de sódio adicionada à mistura. De acordo com o autor, quanto menor a concentração de citrato de sódio, maior é o diâmetro de partícula produzida e conseqüentemente maior o número de aglomerados.

Porém, em relação aos diâmetros de partícula, é relatado na literatura que testes, que visam a captura de antígenos específicos em áreas como biossensoriamento, quando conduzidos com nanopartículas de diâmetros entre 10 e 30 nm apresentam resultados melhores e mais reprodutíveis que os conduzidos com nanopartículas maiores. Isto pode ser explicado, uma vez que nanopartículas menores são mais estáveis e, conseqüentemente, apresentam menor tendência à aglomeração (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951; FRENS, 1973; KUMAR; GANDHI; KUMAR, 2007; HERMANSON, 2013; LY; PARK; PARK, 2016; CARNOVALE *et al.*, 2016).

A estabilidade das soluções coloidais de AuNPs depende da interação destas com o meio em que estão inseridas. Basicamente, existem dois mecanismos de estabilização: a estabilização eletrostática, ou seja, a partir de interações iônicas (Figura 8-A), na qual as nanopartículas se repelem devido à presença de moléculas carregadas na superfície; e a estabilização estérica, ou seja, a partir de interações covalentes (Figura 8-B). Nesta última ocorre a adsorção de aditivos poliméricos ao redor das nanopartículas, devido ao compartilhamento de elétrons presentes nas camadas de valência. Desse modo, as cadeias longas impedem a aproximação de outras AuNPs e, conseqüentemente, minimizam a aglomeração (HANG *et al.*, 2009; MASEREEL *et al.*, 2010).

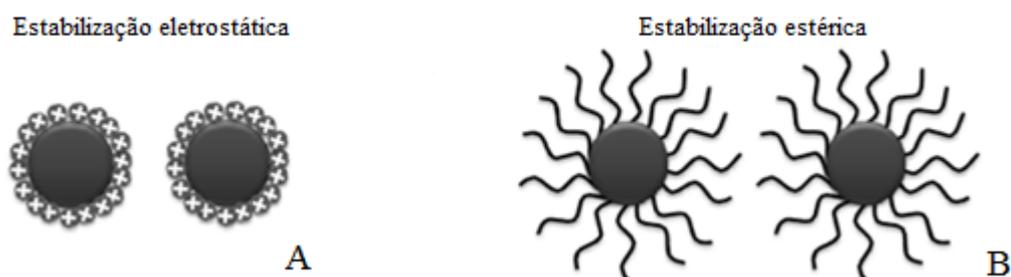


Figura 8. Representação esquemática da estabilização de partículas pelo efeito (a) eletrostático e (b) estérico. (adaptado de MARANGONI, 2012).

As interações covalentes fornecem algumas vantagens quando comparadas às interações iônicas, aumentando, por exemplo, a estabilidade dos bioconjugados, ou seja, das AuNPs modificadas (HANG *et al.*, 2009; MASEREEL *et al.*, 2010).

Visando minimizar a tendência à aglomeração das nanopartículas, a modificação da superfície destas a partir do uso de surfactantes é imprescindível, com o uso de polieletrólitos ou ligantes e estratégias de funcionalização como a formação das monocamadas auto-organizáveis (DONG & LI, 1997; FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003; LOVE *et al.*, 2005; MENDES, 2006).

3.4 ESTRATÉGIA DE FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO: MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZÁVEIS

O estudo e o uso das monocamadas auto-organizáveis, do inglês “self-assembled monolayer” (SAM), tem crescido com o passar dos anos, uma vez que estas podem vir a ser empregadas para a modificação de superfícies metálicas como prata, paládio e ouro, e também para a imobilização de materiais biológicos em dispositivos de biossensoriamento (DONG & LI, 1997; FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003; MENDES, 2006; MENTI, 2016).

Dentre as principais vantagens desta técnica estão a versatilidade, a possibilidade de desenvolver superfícies com propriedades e funções específicas, além de produzir diferentes estruturas de forma altamente ordenada (DONG & LI, 1997; FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003; LOVE *et al.*, 2005; MENDES, 2006; PENGO *et al.*, 2017).

A formação das camadas auto-organizáveis é dividida em duas etapas, seguindo o modelo de Langmuir, no qual há inicialmente uma fase de aumento rápido na espessura da camada - entre 80 e 90% - seguida por uma fase lenta. Esta última tem como principal objetivo assegurar a qualidade da SAM através da compactação das moléculas e redução de possíveis defeitos na monocamada (MENDES, 2006; CANCINO, 2008). Uma representação esquemática da cinética de formação das monocamadas ao longo do tempo pode ser observada na Figura 9.

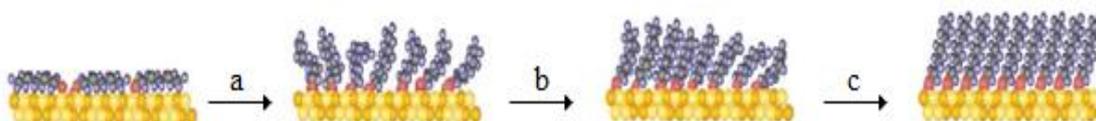


Figura 9. Representação esquemática da cinética de formação das monocamadas auto-organizáveis (SAM): (a) etapa inicial caracterizada pela rápida adsorção e crescimento da espessura do filme, seguida por um processo lento (b) de adsorção e organização, até a formação final (c) da monocamada auto-organizável (adaptado de CANCINO, 2008).

A qualidade das SAMs é diretamente afetada por fatores como rugosidade do substrato, tempo de contato com a superfície, concentração do solvente e temperatura do meio. Além disso, a topografia da SAM reproduz fielmente a superfície do substrato e, conseqüentemente, seus defeitos superficiais. Um dos principais tipos de defeitos encontrados em superfícies de ouro é a vacância monoatômica, ou seja, a superfície apresenta irregularidades como a redução de átomos de ouro, afetando diretamente a formação, a organização e a eficiência da SAM (LOVE *et al.*, 2005; MENDES, 2006).

Geralmente, para a funcionalização de superfícies de ouro são empregados os chamados alcanotóis pela estabilidade química e fácil formação das monocamadas auto-organizáveis. Entretanto, variados agentes estabilizantes podem ser empregados, destacando o citrato de sódio quando mantido em excesso na solução coloidal, o brometo de cetrimônio (CTAB), o polietilenoglicol (PEG), a sílica, entre outros (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003; LOVE *et al.*, 2005; ARYA *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2012; OH *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013; CARNOVALE *et al.*, 2016). Uma breve comparação entre tais estabilizantes é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação entre diferentes agentes estabilizantes relatados na literatura (adaptado de <https://nanohybrids.net/pages/what-is-the-difference-between-citrate-ctab-peg-silica-coatings>. Acessado em abr. 2018.)

	Citrato de sódio	CTAB	PEG	Sílica
Força da ligação à superfície	Fraca	Moderada	Muito forte	Muito forte
Habilidade de modificar a superfície	Muito fácil	Fácil	Difícil	Moderada
Fator de estabilização	Estabilização eletrostática	Estabilização eletrostática	Estabilização estérica	Estabilização eletrostática
Citotoxicidade	Não	Sim	Não	Não
Estabilidade ao calor	Boa	Excelente	Baixa	Boa
Estabilidade em PBS	Instável	Instável	Estável	Moderado

A estabilização das AuNPs também pode ser conduzida através de polímeros multifuncionais, ou seja, polímeros com variados grupamentos funcionais em sua estrutura, como por exemplo, metilas, aminos, carboxilas, carbonilas, hidroxilas e ainda sulfidrilas, uma vez que esse último se liga fortemente e de forma espontânea ao ouro, devido à forte interação entre os átomos de ouro e o enxofre.

O átomo de ouro apresenta em sua configuração eletrônica o subnível 5d completo e

apenas um elétron no subnível 6s. Os demais orbitais presentes estão submetidos à influência elétrica do subnível fechado d. Portanto, a interação em nível de ligação entre o enxofre e as AuNPs podem ser entendidas como uma disponibilidade de carga e compatibilidade entre os subníveis desses átomos. O atrativo desta abordagem é a possibilidade de controlar a estabilidade das soluções coloidais explorando as propriedades de carga dos complexos metálicos, enquanto estes polímeros conferem suas características e propriedades às nanopartículas modificadas (TOMA *et al.*, 2010; ISAEVA; KIRYUKHINA; GORBUNOVA, 2013).

A partir da análise das características apresentadas na Tabela 3, destaca-se o uso do PEG com diferentes grupamentos funcionais e massas molares, uma vez que este não apresenta a habilidade de modificar a superfície, com que está em contato, não apresenta citotoxicidade e ainda mantém a estabilidade em PBS. Além das características já mencionadas, o PEG é um polímero solúvel em água, comumente empregado como espaçador em estratégias de modificação de superfícies.

3.4.1 Polietilenoglicol heterobifuncional

O PEG exibe imunogenicidade e não apresenta antigenicidade, ou seja, não prejudica proteínas ou células ativas, mesmo quando interagindo diretamente com elas. Ainda é destacado por aumentar a solubilidade de grandes moléculas, independentemente do seu tamanho e prevenir casos de aglomeração quando empregado como surfactante em soluções de nanopartículas (ALCANTAR; AYDIL; ISRAELACHVILI, 2000; GHOSH *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2012; OH *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013; CARNOVALE *et al.*, 2016).

Uma representação esquemática de uma nanopartícula funcionalizada com PEG heterobifuncional pode ser visualizada na Figura 10. É possível observar a interface Au-SR, e também a interface orgânica da cadeia polimérica juntamente com o seu grupamento funcional terminal, o qual é capaz de interagir com os compostos de interesse, como por exemplo, espécies presentes em meios contaminantes (LOVE *et al.*, 2005, CANCINO, 2008). Entretanto, para que esta interação ocorra de forma uniforme e eficaz, fatores como o tamanho da cadeia polimérica e, conseqüentemente, a conformação desta, o meio em que as soluções coloidais serão funcionalizadas e a concentração de polímero empregada, devem ser avaliados.

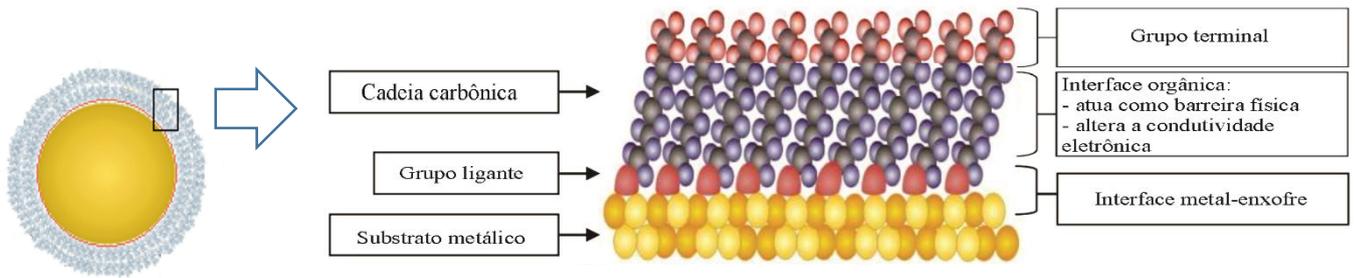


Figura 10. Representação esquemática da monocamada auto-organizável de polietilenoglicol sobre a superfície da nanopartícula de ouro (adaptado de CANCINO, 2008)

Rahme *et al.* (2013) avaliaram a influência do uso de polietilenoglicóis tiolados com diferentes massas molares (entre 2100 e 51.000 g/mol) e, conseqüentemente, tamanho de cadeia polimérica sobre o diâmetro, estabilidade, número e conformação dos ligantes poliméricos sobre a superfície de AuNPs de 15 nm sintetizadas em laboratório. Os autores relataram que o diâmetro das partículas aumentou proporcionalmente com o tamanho da cadeia polimérica. Além disso, observaram através de análise termogravimétrica (TGA) que o número de ligantes decaiu de forma não linear em função do aumento das cadeias poliméricas do PEG, devido ao aumento da entropia conformacional destas. Este efeito foi observado a partir do uso de polímeros com massas molares superiores a 10.000 g/mol e pode ser visto na Figura 11.

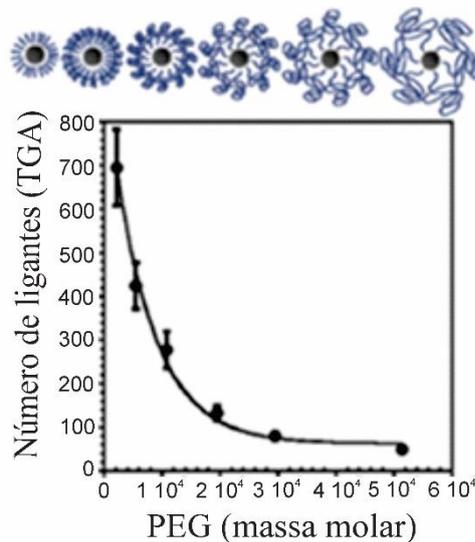


Figura 11. Relação entre o número de ligantes estimado através de análise termogravimétrica (TGA) em função da massa molar do polietilenoglicol (adaptado de RAHME *et al.*, 2013).

As conformações dos polímeros de diferentes massas molares relatadas por Rahme *et al.* (2013) podem ser divididas em duas classificações: escova para os polímeros de baixa massa molar e cogumelo para os de massa molar elevada. Na primeira, pelo fato do número de ligantes ser elevado, estes se alinham de forma semelhantes a cerdas longas e finas, elevando a possibilidade de captura de compostos de interesse e também aumentando o recobrimento da superfície das nanopartículas. No segundo tipo de conformação, por outro lado, devido à alta entropia conformacional, as cadeias poliméricas ocupam aproximadamente uma semiesfera, diminuindo exponencialmente o número de ligantes e, conseqüentemente, afetando a captura dos compostos de interesse. Ambas as conformações podem ser observadas na Figura 12 (JOKERST *et al.*, 2011).

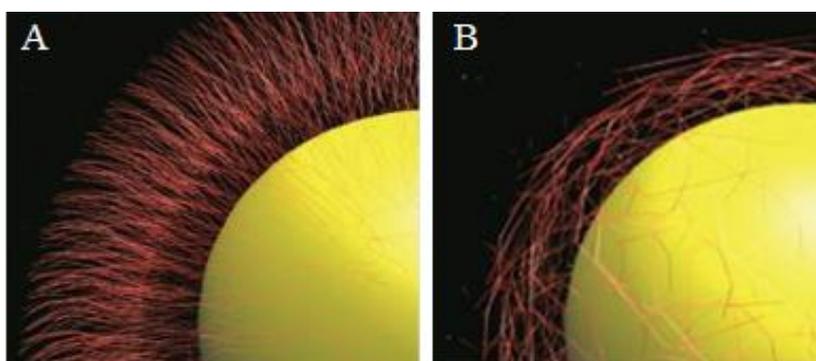


Figura 12. Conformações das cadeias de polietilenoglicol na superfície das nanopartículas de ouro nas configurações de (A) escova e (B) cogumelo (adaptado de JOKERST *et al.*, 2011).

Embora se saiba que a funcionalização de AuNPs com PEG aumenta sua estabilidade, a influência de variados meios sobre esse fator ainda vêm sendo estudada. Na literatura é possível observar o uso de meios como água ultrapura, soluções tamponadas em diferentes pH, solução salina tamponada com fosfato (PBS) e até solventes orgânicos, como o diclorometano (DCM) (MANSON; KUMAR; MEENAN, 2011; WANG *et al.*, 2014).

Em relação à concentração de PEG tiolado, esta ainda vêm sendo estudado por muitos autores. Sendo assim, é possível encontrar na literatura uma extensa faixa de concentrações empregadas, podendo variar entre 0,024 mg/mL (PAROLO *et al.*, 2013) e 15 mg/mL (LING; JIANG; ZHANG, 2013) dependendo do diâmetro e concentração da solução coloidal de ouro.

Uma vez que foram utilizados neste trabalho 3 diâmetros distintos de nanopartículas (20, 40 e 80 nm), inicialmente foi necessário empregar métodos indiretos para a obtenção da concentração ideal e da cinética de adsorção de PEG heterobifuncional para cada uma das

soluções coloidais de nanopartículas de ouro.

O princípio das técnicas estudadas foi a quantificação de grupos sulfidrílicos remanescentes nas soluções, após a etapa de funcionalização. Dentre as metodologias estudadas destacam-se as com princípios colorimétricos e cromatográficos.

3.4.1.1 Avaliação da adsorção de grupos sulfidrílicos pelas nanopartículas de ouro: método colorimétrico

Em 1961, Ellman e colaboradores introduziram o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), também conhecido como DTNB, como um composto solúvel em água versátil para quantificar grupos sulfidrílicos livres em solução (-SH). O princípio desta reação está no fato do DTNB, quando reduzido pelas sulfidrilas em solução, produzir um produto de cor amarela, o ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB²⁻). A reação de redução do DTNB com grupos sulfidrílicos pode ser observada na Figura 13.

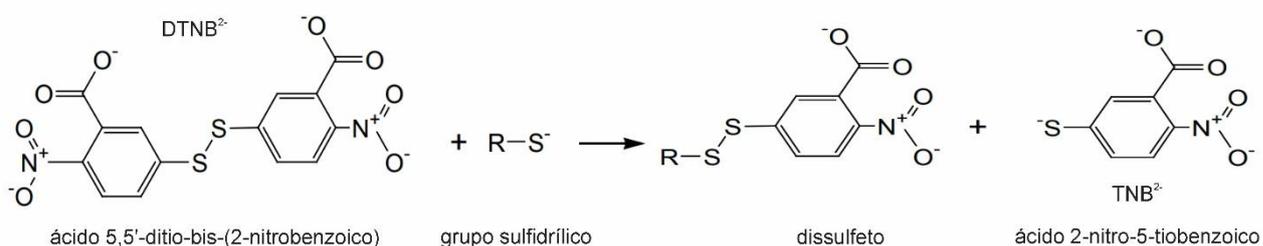


Figura 13. Reação de redução do ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB²⁻) (adaptado ELLMAN *et al.*, 1961).

Durante a reação de redução, o DTNB²⁻ reage com um grupo sulfidrílico livre para produzir um dissulfureto misto e ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB²⁻). O alvo do DTNB nesta reação é a base conjugada (R-S⁻) de um grupo sulfidrílico livre. Entretanto, a taxa desta reação depende de vários fatores: 1) o pH da reação, 2) o pKa dos grupos sulfidrílicos e 3) a presença de impedimentos estéricos e eletrostáticos. O TNB²⁻ é o composto “colorido” produzido nesta reação, e que possui coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de 14,150/M·cm no comprimento de onda de 412 nm.

3.4.1.2 Avaliação da adsorção de grupos sulfidrílicos pelas nanopartículas de ouro: método cromatográfico

A cromatografia é um processo de separação de misturas baseada no uso de duas fases, no qual as substâncias presentes são distribuídas. A fase estacionária pode ser composta por um material sólido e poroso ou uma fina camada líquida revestida por um suporte sólido ou paredes da coluna, enquanto que a fase móvel pode ser gasosa ou líquida. Dentre as principais vantagens desta técnica estão a especificidade, sensibilidade e a precisão nos resultados (KATRUSIAK *et al.*, 2001; MEYER, 2010).

Sendo assim, a fim de complementar os resultados obtidos a partir do método colorimétrico, a técnica cromatográfica foi empregada. O objetivo desta, assim como no método anterior, se baseou na medição do TNB presente nas soluções.

As etapas subsequentes foram desenvolvidas com foco na especificidade, seletividade e sensibilidade ao sistema a partir da conjugação de elementos de reconhecimento de antígenos específicos - anticorpos - sobre a superfície das nanopartículas funcionalizadas.

3.4.2 Anticorpos

Os anticorpos são glicoproteínas pertencentes à classe das imunoglobulinas (Ig) que têm como função a defesa dos organismos. Estes podem ser obtidos por meio de uma resposta imune de um animal (rato, coelho, macaco, entre outros) após injeção de um antígeno, resultando em um processo de imunização, no qual o animal é posteriormente sangrado e o soro contendo os anticorpos de interesse é purificado. Estas proteínas possuem alto grau de afinidade e especificidade, com capacidade para detectar, reconhecer e ligar-se ao antígeno alvo (HOPKINS, 2009; MANDAL, 2014; ABBAS *et al.*, 2015).

Cada anticorpo possui duas estruturas principais de ligação, um domínio constante ou Fc (do inglês “fragment constant”) e um domínio de ligação com o antígeno ou Fab (do inglês “fragment antigen-binding”). A região Fc é apta a ligar-se a vários tipos de estruturas, inclusive a compostos com grupamentos amino por possuir um grupamento carboxílico em sua terminação. Já o domínio Fab apresenta uma região amino terminal, sendo esta responsável pelo reconhecimento do antígeno e, conseqüentemente, pela especificidade da molécula (BEYER *et al.*, 2009; HOPKINS, 2009; MANDAL, 2014; STANFIELD, 2014; ABBAS *et al.*, 2015).

Anticorpos podem se ligar a diferentes superfícies e têm sido utilizados como moléculas de reconhecimento organizadas sobre nanopartículas funcionalizadas. Uma representação esquemática de uma nanopartícula funcionalizada e conjugada com o elemento de reconhecimento, e a estrutura e os domínios de um anticorpo pode ser observada na Figura 14.

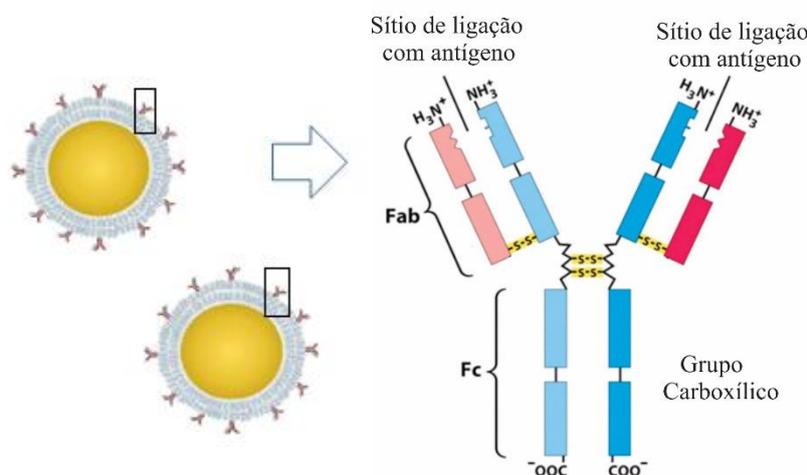


Figura 14. Representação esquemática da estrutura e dos domínios de um anticorpo. O grupo carboxílico na porção do domínio constante (Fc) ligado a um polímero funcionalizado sobre a nanopartícula (esquerda) e o grupamento amino livre na porção do domínio de ligação com o antígeno (Fab) para reconhecer o antígeno (direita) (adaptado de MANDAL, 2014).

O princípio da ligação entre um epítipo de um antígeno e o seu anticorpo envolve a complementaridade de suas estruturas e dependendo da quantidade de epítopos específicos com que estes são capazes de interagir, eles podem ser classificados como monoclonais ou policlonais. Além disso, a ligação epítipo e anticorpo é reversível e envolve interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de van der Waals (LIPMAN *et al.*, 2005; ABBAS *et al.*, 2015).

Com relação aos anticorpos monoclonais, a sua especificidade é dirigida a um único epítipo do antígeno e devido a esta característica o uso destes permite o desenvolvimento de testes em que duas substâncias relacionadas podem ser diferenciadas, enquanto que os anticorpos policlonais são compostos por diferentes epítopos, podendo ser vantajosos em situações nas quais a variação da substância alvo é conhecida (LIPMAN *et al.*, 2005; ABBAS *et al.*, 2015).

A decisão de utilizar anticorpos mono ou policlonais está relacionada com diversos fatores, entre eles o fato de que anticorpos policlonais podem ser gerados muito mais rapidamente, com menor custo e com menor habilidade técnica do que o necessário para produzir os anticorpos monoclonais. Entretanto, dentre as principais vantagens do uso dos

anticorpos monoclonais são sua homogeneidade e consistência. Na Figura 15, uma representação entre anticorpos monoclonais e policlonais juntamente com as possibilidades de interação entre os epítomos do antígeno de interesse está apresentada (LIPMAN *et al.*, 2005; KELLY, 2007).

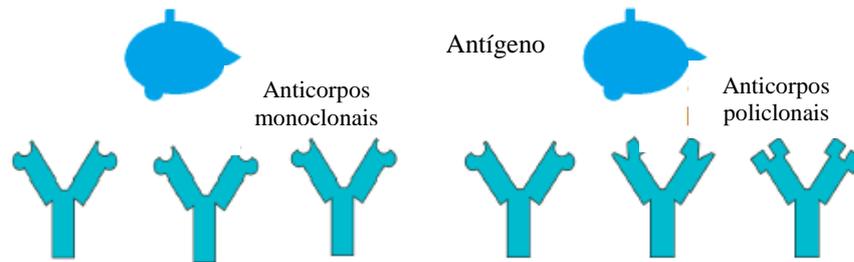


Figura 15. Representação entre anticorpos monoclonais e policlonais juntamente com as possibilidades de interação entre os epítomos do antígeno de interesse (adaptado de KELLY, 2007).

Na Figura 16 é apresentado um exemplo de uma AuNP modificada com um tiol presente na solução de PEG heterofuncional (HS-PEG-NH₂). Neste caso, há uma ligação covalente por meio do grupamento –SH, enquanto que o grupo COO⁻ da região Fc do anticorpo previamente ativada através do uso de agentes de acoplamento, como o 1-etil-(3-dimetilaminopropilo)-carbodiimida (EDC), pode interagir com os grupos aminos do PEG (LIPMAN *et al.*, 2005; MASEREEL *et al.*, 2010; ABBAS *et al.*, 2015).

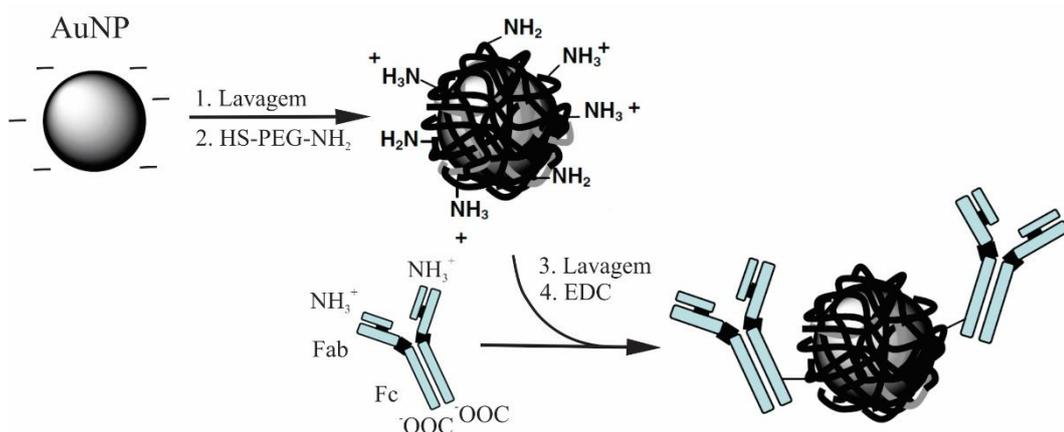


Figura 16. Exemplo das etapas de funcionalização e conjugação dos elementos de reconhecimento na superfície de uma nanopartícula de ouro devido à interação entre o grupo carboxílico presente no domínio constante do anticorpo ligado ao polímero funcionalizado (adaptado de MASEREEL *et al.*, 2010)

Uma vez que o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes estratégias de funcionalização, o uso da enzima horseradish peroxidase (HRP) como alternativa de captura antigênica foi de caráter essencial, principalmente nas etapas que visavam estudar a eficiência de captura.

3.4.3 Horseradish peroxidase (HRP)

A horseradish peroxidase ou peroxidase de raiz forte (HRP) é uma enzima de massa molar de 40 kDa, pertencente à classe das enzimas peroxidases. A classe destas encontra-se amplamente distribuída na natureza e pode ser facilmente extraída de células de várias plantas, fungos, animais e micro-organismos, além de ser considerada termoestável. Estas são capazes de catalisar a reação do peróxido de hidrogênio com certos substratos orgânicos doadores de elétrons para produzir produtos coloridos (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002; FERNANDES *et al.*, 2012; HERMANSON, 2013).

Existe um amplo interesse pela HRP, devido as suas múltiplas aplicações nas indústrias de papel e celulose, de alimentos, em análises bioquímicas e tratamentos de resíduos e em especial em ensaios de diagnóstico, visto que esta é conjugada a aproximadamente 80% de todos os anticorpos utilizados durante esses testes. Além disso, estas enzimas são amplamente utilizadas em reações de síntese orgânica e na construção de biossensores (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002; JIA *et al.*, 2002; REGALADO *et al.*, 2004; BRONDANI *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2012; HERMANSON, 2013).

Dentre os principais fatores que fazem com que esta enzima seja utilizada estão a simplicidade de uso, o baixo custo, a estabilidade e vida útil longa, visto que esta é estável durante anos em estado liofilizado e quando purificada pode ser armazenada por meses sem perda significativa de atividade (HERMANSON, 2013; FERNANDES *et al.*, 2012).

3.4.3.1 Método para avaliação da captura da enzima HRP

O método empregado para a medição indireta da captura da enzima HRP para as quatro estratégias de funcionalização consistiu na reação desta com seu substrato fundamental, o H₂O₂, formando um intermediário estável, o qual se dissocia na presença de um doador de elétrons e ocasiona uma mudança na coloração da solução. O doador pode consistir de moléculas

oxidáveis, como o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); entretanto, uma grande variedade de substratos pode ser empregada. Alguns deles podem ser usados para formar produtos coloridos para uso em sistemas de detecção espectrofotométricos, enquanto outros ocasionam a geração de produtos fluorescentes ou quimioluminescentes após a oxidação com a HRP (KADNIKOVA; KOSTIĆ, 2002; HERMANSON, 2013). O princípio da reação de oxidação do ABTS empregado para a quantificação indireta da captura da enzima HRP pode ser observado na Figura 17.

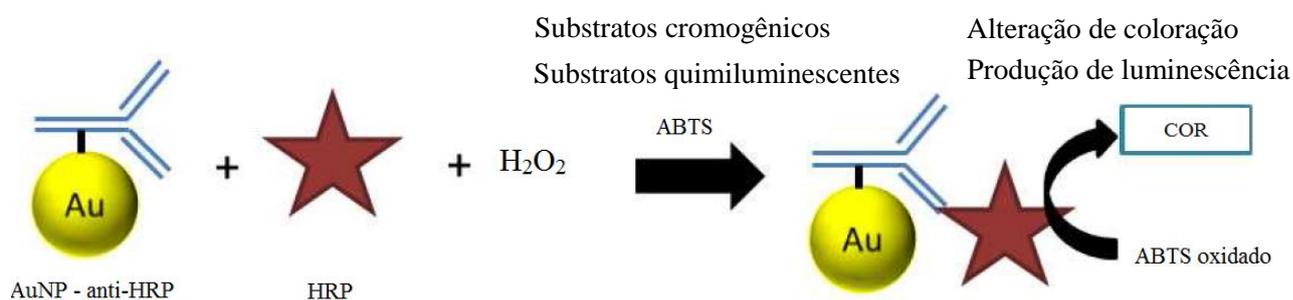


Figura 17. Princípio da reação de oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) empregada para a medição indireta da captura da enzima HRP para as quatro estratégias de funcionalização (adaptado de PAROLO *et al.*, 2013).

A HRP é constituída por 308 resíduos de aminoácidos, dois íons Ca²⁺ e sítio ativo composto por uma ferroprotoporfirina IX, sendo este denominado grupo heme, que está ligado não covalentemente à cadeia polipeptídica, como observado na Figura 18. O íon férrico central da referida protoporfirina está coordenado a um resíduo de histidina. A presença da estrutura heme dá à enzima sua coloração característica e absorção máxima a 403 nm (RUZGAS *et al.*, 1996).

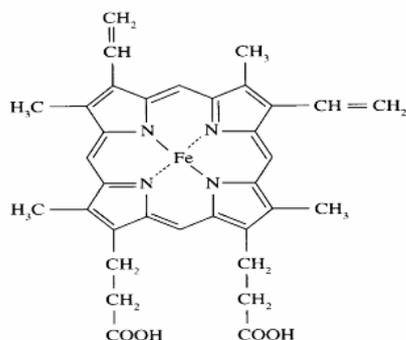
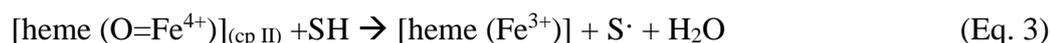
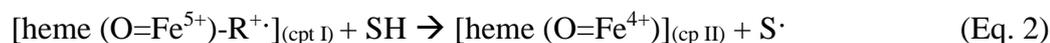
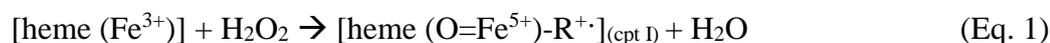


Figura 18. Grupo ferroprotoporfirina IX (“grupo heme”), sítio ativo da enzima horseradish peroxidase (VEITCH, 2004).

Um exemplo do ciclo catalítico destas enzimas, a partir do uso de um agente doador SH, é mostrado de forma simplificada nas etapas a seguir (FREIRE *et al.*, 2003).



A equação 1 envolve a oxidação do grupo heme da peroxidase pelo H_2O_2 o por dois elétrons e a formação de um composto intermediário, no estado (Fe^{5+} , Composto I), consistindo do ferro oxiferril (O=Fe^{5+}) e do cátion radical π porfirínico. Na equação 2, o composto intermediário (Fe^{5+}) sofre uma reação de redução pela transferência de um elétron do doador SH, formando composto intermediário, no estado de oxidação (Fe^{4+} , Composto II). Um elétron adicional pode ser transferido, proveniente de uma segunda molécula SH (Equação 3), de forma que a enzima retorne a forma nativa (Fe^{3+}). Nas etapas 2 e 3, a espécie doadora de elétrons (SH) é oxidada (FREIRE *et al.*, 2003).

Tendo em vista à obtenção de uma estratégia viável para a captura do Zika vírus nas etapas futuras do projeto em que este plano está inserido, as estratégias desenvolvidas foram aplicadas em testes de diagnóstico virais a fim de se comprovar se haveria incremento na sensibilidade dos dispositivos.

3.5 APLICAÇÕES DE ESTRATÉGIAS DE FUNCIONALIZAÇÃO EM TESTE DE DIAGNÓSTICO VIRAIS

A aplicação de nanopartículas para aprimoramento de captura de analitos em testes de ELISA já vem sendo reportados na literatura com resultados bastante promissores, principalmente utilizando nanopartículas com dimensões inferiores a 50 nm (ZHAN *et al.*, 2014; LAKSHMIPRYA *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2017)

Zhan *et al.* (2014) sintetizaram nanopartículas de ouro de $22,4 \pm 0,27$ nm e as empregaram em teste ELISA para detecção do vírus sincicial respiratório (RSV). Assim como relatado pelos autores, o uso das nanopartículas possibilitou que o limite de detecção do teste fosse reduzido em 50 vezes, de 25 pg/mL para o teste ELISA convencional para 0,5 pg/mL com a implementação das nanopartículas.

Kim *et al.* (2017) inicialmente avaliaram a influência de diferentes diâmetros de nanopartículas de ouro (5, 10, 15, 20, 30 e 50 nm) quando implementados em teste ELISA. Foi relatado que as maiores absorvâncias foram observadas para as nanopartículas de 10 nm e as menores para as de 30 nm, indicando que as absorvâncias parecem não ter correlação exata com o tamanho das partículas, assim como descrito por Bell *et al.*, (2013). Na sequência os autores implementaram as nanopartículas de 10 nm ao teste ELISA convencional e observaram que estas possibilitaram uma redução de 100 vezes no limite de detecção, passando de 10 ng/mL para 0,1 ng/mL.

Ainda relacionado à avaliação da influência de diferentes tamanhos de nanopartículas para a implementação em testes ELISA, Lakshmiprya *et al.* (2016) avaliaram o incremento proporcionado por nanopartículas de 10 e 80 nm quando implementadas em teste ELISA para diagnóstica de tuberculose a partir da proteína ESAT-6. Ao empregarem a concentração de 250 nmol/L da proteína aos sistemas contendo as nanopartículas a diferença entre as absorvâncias dessas foi de apenas 0,02, indicando a razão da grande maioria dos autores empregar nanopartículas menores. Uma vez que estas apresentam menores variações de tamanhos quando sintetizadas e possuem maior estabilidade (LY; PARK; PARK, 2016; CARNOVALE *et al.*, 2016).

Apesar dos inúmeros avanços proporcionados pela implementação de nanopartículas de ouro em testes ELISA, duas das doenças que mais acometem a população mundial, ou seja, AIDS e Hepatite C, as quais ainda são diagnosticadas por meio de testes, que apesar de serem altamente sensíveis e específicos, são demorados, trabalhosos, caros e exigem equipamentos especializados. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2017) cerca de 36,9 milhões e 71 milhões de pessoas viviam com AIDS (HIV) e Hepatite C (HCV), no final de 2017, e sendo que destas cerca de 2,3 milhões possuíam ambas as doenças. Ainda segundo a OMS (2019), aproximadamente 1,3 milhões de mortes foram ocasionadas por ambas as doenças no mesmo período.

Sendo assim, a utilização de dispositivos sensíveis, específicos, de diagnóstico rápido e de custo reduzido seria crítico para o controle de ambas as doenças, especialmente em países em desenvolvimento com recursos limitados e altas taxas de infecção, como por exemplo, o Egito (SHAWKY; BALD; AZZAZY, 2010). Dessa forma, assim como destacado por Zhan *et al.* (2014), Kim *et al.* (2017), Lakshmiprya *et al.* (2016) e Shawky *et al.* (2016), as nanopartículas se mostram uma grande promessa de atender às rigorosas demandas do laboratório clínico quanto à sensibilidade e custo-efetividade, e podem ser usadas no futuro em

termos de diagnóstico de cuidados, possibilitando diagnósticos precoces e, conseqüentemente, reduzindo o número de contágios e o número de mortes.

Sendo assim, tendo em vista a capacidade dos agentes estabilizantes para a dispersar AuNPs e criar um ambiente biocompatível para imobilização, neste estudo foram utilizadas AuNPs de diferentes tamanhos – 20, 40 e 80 nm – estabilizadas em PEG heterofuncional (HS-PEG-NH₂), para a avaliação de diferentes estratégias de funcionalização sobre a captura da macromolécula orgânica HRP. Ainda com o objetivo de aplicar métodos de funcionalização de nanopartículas para aumentar a sensibilidade de captura antigênica de analitos, procedeu-se a implementação das nanopartículas estabilizadas e funcionalizadas em testes comerciais baseados na detecção qualitativa de anticorpos para o vírus da hepatite C e AIDS (Bioclin Biolisa HCV e HIV), visando à obtenção de uma estratégia viável para a captura do Zika vírus nas etapas futuras do projeto em que este plano está inserido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

As soluções coloidais de AuNPs de diferentes tamanhos – 20, 40 e 80 nm – mantidas em citrato de sódio foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich. Assim como fornecido pela empresa, estas possuem $6,54 \times 10^{11}$, $7,2 \times 10^{10}$ e $7,8 \times 10^9$ partículas/mL, respectivamente, e índices de polidispersão inferiores a 0,2.

As três variedades de PEG utilizadas (PEG-NH₂ 5000 g/mol, HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol) possuem cadeias poliméricas lineares e foram adquiridas juntamente com as soluções coloidais de AuNPs, com a solução de anticorpos monoclonais anti-HRP e com a enzima peroxidase da empresa Sigma-Aldrich.

Já os kits para a determinação qualitativa de anticorpos totais para os vírus da hepatite C (Biolisa HCV – K128) e AIDS (Biolisa HIV 1/2/0 – K118) foram adquiridos da empresa Bioclin. Segundo informações dispostas pela empresa, ambos os kits apresentam sensibilidade e especificidade clínica superiores a 99,7%. Os kits são compostos por placa sensibilizada, solução contendo o conjugado, solução diluente do conjugado, solução de lavagem, substrato A e substrato B, solução de parada, controle positivo e seladores de placa.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

A caracterização das soluções coloidais de AuNPs foi realizada através das técnicas de espectroscopia de absorção molecular na região do visível, espalhamento dinâmico da luz (DLS), potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), a fim de verificar o diâmetro médio das nanopartículas, a tendência a aglomeração, a estabilidade e também a eficiência de captura das diferentes estratégias de funcionalização.

4.2.1 Espectroscopia de absorção molecular na região do visível

Essa foi uma das técnicas utilizadas para o monitoramento da tendência à aglomeração e estabilidade das soluções coloidais de AuNPs, antes e após a etapa de estabilização com PEG,

em diferentes meios dispersantes. Além disso, a espectroscopia de absorção molecular na região do visível também foi utilizada para a avaliação da eficiência de captura das diferentes estratégias de funcionalização, tendo sido empregado anteriormente a cada uma das análises, como branco, a solução de água ultrapura para todos os testes avaliados por meio desta técnica.

As leituras, entre a faixa de 400 e 800 nm, foram realizadas em espectrofotômetro modelo Spectramax M2e (Molecular Devices), no Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA, localizado no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV/FEG)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para analisar a dispersão das partículas e a presença de aglomerados nas soluções de AuNPs antes e após a etapa de estabilização e também a presença do PEG adsorvido durante esta última etapa. A preparação das amostras consistiu em secá-las sobre porta-amostras de alumínio e silício em vácuo.

Visando a melhora da resolução das imagens, as amostras passaram inicialmente por uma etapa de deposição de ouro em metalizadora Denton Vacuum durante 20 s. Para esta etapa foi empregada corrente de 35 mA e pressão de 10^{-3} Pa.

Dois microscópios eletrônicos de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) foram empregados para as análises: a) Mira3/Tescan - Laboratório Central de Microscopia, (LCMIC) da Universidade de Caxias do Sul; b) Jeol 7100 FT - Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), Rio de Janeiro.

4.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão possibilitou a medição dos tamanhos das nanopartículas de ouro e também a avaliação da espessura da camada de PEG adsorvida pelas partículas durante a etapa de estabilização. A preparação das amostras consistiu em depositar a amostra sobre grids de cobre e deixá-las secar em vácuo. Um microscópio eletrônico de transmissão (MET-FEG) JEOL 2100 F de 200 kV pertencente ao Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), Rio de Janeiro, foi empregado para esta análise.

4.2.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O espalhamento dinâmico da luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) foi utilizado para medir o tamanho das partículas adquiridas, tendo em vista a distribuição de tamanho das partículas em função da intensidade e também o grau de agregação das mesmas, antes e após a etapa de estabilização. Foi utilizado equipamento Brookhaven (goniômetro BI200M, correlação digital BI9000AT) com laser polarizado vertical He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) e ângulo de espalhamento fixo de $\theta = 90^\circ$ pertencente ao Laboratório E-116 do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2.5 Potencial zeta (PZ)

As análises de potencial zeta foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nano (Malvern) em $\lambda = 632,8$ nm, usando um laser He-He, pertencente ao Laboratório E-116 do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.3 METODOLOGIA

A Figura 19 representa o fluxograma da metodologia utilizada nas diferentes etapas da presente dissertação para a estabilização e funcionalização das AuNPs, para a captura da HRP e para a implementação das estratégias de funcionalização nos kits de determinação qualitativa de anticorpos totais para os vírus da hepatite C e AIDS.

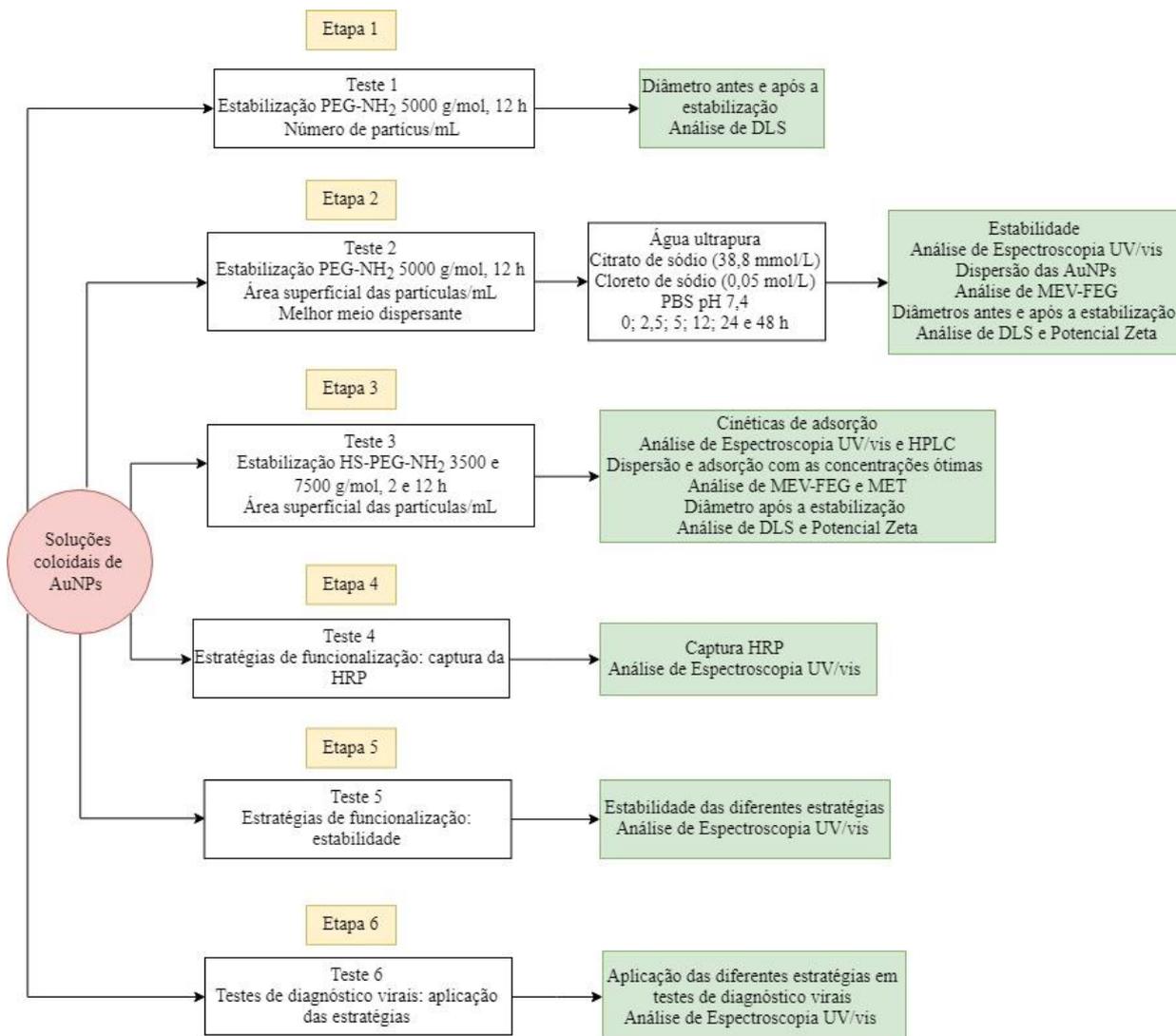


Figura 19. Fluxograma do procedimento experimental utilizado na estabilização e funcionalização das nanopartículas de ouro, a captura da horseradish peroxidase e implementação das estratégias de funcionalização nos kits de diagnóstico virais.

4.3.1 Estabilização das nanopartículas de ouro

Inicialmente, diluições foram realizadas com as soluções de nanopartículas de ouro e os espectros de extinção destas foram medidos em espectrofotômetro, modelo Spectramax M2e (Molecular Devices), a fim de relacionar este parâmetro com o número de partículas/mL. Uma vez que as soluções de AuNPs foram submetidas a etapas de lavagem durante cada uma das etapas, ou seja, a centrifugações (14.000 rpm, 4°C, 25 e 15 min) em equipamento modelo 5430 R (Eppendorf), nas quais os sobrenadantes eram descartados e os precipitados ressuspendidos em água ultrapura, a fim de remover impurezas, esse procedimento foi realizado

a fim de possibilitar que as proporções entre as extinções das AuNPs e o número de partículas/mL, ou área superficial/mL das AuNPs, fossem mantidas em todos os testes.

A estabilização das soluções coloidais de nanopartículas de ouro foi conduzida em três etapas: etapa 1 - avaliação da influência da concentração de PEG amino terminal sobre o diâmetro médio de partícula; etapa 2 - avaliação do melhor meio dispersante; e etapa 3 - verificação da concentração ótima de polietilenoglicol para cada uma das soluções (Figura 19, página 48). O protocolo de estabilização empregado foi adaptado de Ling, Jiang, Zhang, (2013), no qual são sintetizadas nanopartículas de ouro de 26 nm (concentração de $1,689 \times 10^{11}$ partículas/mL e área superficial de $3,59 \times 10^{-4}$ m²/mL) e para cada 1 mL de solução de nanopartículas são adicionados 3 mL de solução de PEG (concentração de 15000 µg/mL) para estabilizá-las.

A etapa 1 teve como principal objetivo avaliar como a estabilização baseada na proporção entre o número de partículas/mL e a concentração de PEG amino terminal de massa molar 5000 g/mol (PEG-NH₂ 5000) influenciaria na variação de diâmetros médio das partículas em solução. Para isso, as concentrações das soluções de nanopartículas de ouro foram de $6,54 \times 10^{10}$, $7,16 \times 10^9$, $7,82 \times 10^8$ partículas/mL para as AuNPs de 20, 40 e 80 nm e estas foram estabilizadas com concentrações entre 10 e 1000 µg/mL de PEG-NH₂. Inicialmente, as soluções comerciais de AuNPs foram mantidas em contato com PEG-NH₂ 5000 por 12 h. Na sequência, as soluções passaram por duas etapas de centrifugação (14.000 rpm, 4 °C, 25 min) em equipamento modelo 5430 R (Eppendorf) para a remoção do excesso de polímero e o precipitado foi diluído na razão 1:10 (v/v) em água ultrapura (Figura 20) e analisado quanto à variação de diâmetros das partículas para as soluções coloidais, antes e após a funcionalização

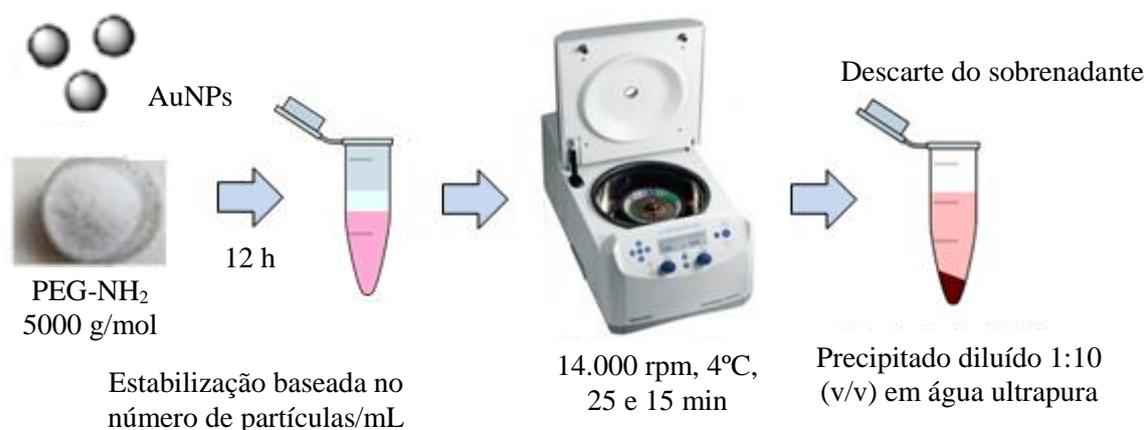


Figura 20. Representação esquemática da metodologia empregada na primeira etapa da estabilização das soluções de nanopartículas de ouro com PEG-NH₂ 5000 g/mol

Tendo em vista o aprimoramento da estratégia de estabilização para os demais testes, a proporção entre as soluções coloidais de AuNPs e a solução de PEG foi adaptada, baseando-se na área superficial total de cada uma das soluções de AuNPs. Dessa forma, foi levado em consideração tanto o número de nanopartículas/mL quanto o diâmetro das AuNPs dispersas.

Na etapa 2, a concentração de PEG-NH₂ 5000 que se mostrou mais promissora na etapa 1 foi empregada para a estabilização de todas as soluções de AuNPs. Na sequência, estas foram adicionadas a variados meios dispersantes: citrato de sódio (38,8 mmol/L), cloreto de sódio (0,05 mol/L), tampão fosfato de sódio (PBS) (0,1 mol/L, pH 7,4) e água ultrapura, a fim de avaliar a estabilidade das soluções de AuNPs em função do tempo de contato com os meios, sendo esta avaliada durante 0; 2,5; 5,5; 8,5; 12; 24 e 48 h, buscando definir o melhor meio dispersante para as demais etapas (Figura 21). A estabilidade das soluções de AuNPs nos diferentes meios foi avaliada através da técnica de espectroscopia na região do visível, tendo sido definido o meio mais estável o que apresentou menor variação nos valores de extinção medidos com o passar do tempo. Uma vez definido o melhor meio dispersante foram realizadas imagens em microscópio eletrônico de varredura (MEV/FEG) da melhor condição em tempos distintos, a fim de comprovar os resultados obtidos em espectrofotômetro. Além disso, a variação de diâmetros das partículas para as soluções coloidais após a estabilização foi aferida pela técnica de DLS.

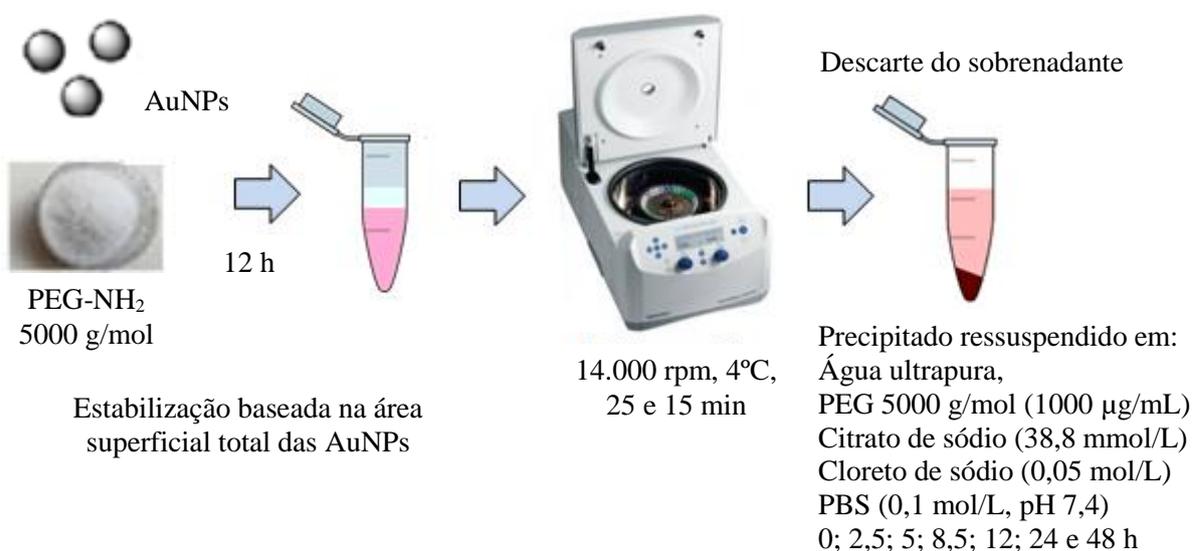


Figura 21. Representação esquemática da metodologia empregada na etapa 2 da estabilização das soluções de nanopartículas de ouro com PEG-NH₂ 5000 g/mol

Para a terceira etapa, dois polímeros com grupamentos tiol e amino de massas molares 3500 g/mol (HS-PEG-NH₂ 3500) e 7500 g/mol (HS-PEG-NH₂ 7500), foram utilizados nesta e para as demais etapas desenvolvidas na sequência, devido a características como a facilidade de formação da ligação forte entre o tiol e o ouro e também pela estabilidade dos bioconjugados destes.

Visando à determinação das cinéticas de adsorção, das concentrações ótimas destes polímeros e das modelagens matemáticas para cada uma das soluções coloidais de AuNPs, a faixa de concentrações de ambos os polietilenoglicóis avaliadas variou entre 0,25 a 30 mg/mL para o HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e entre 1,2 a 10 mg/mL para o HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol na etapa 3.

A etapa 3 foi iniciada por duas etapas de centrifugação (14.000 rpm, 4 °C, 25 min), em equipamento modelo 5430 R (Eppendorf), para a remoção de possíveis impurezas, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em água ultrapura. Os espectros de extinção das soluções finais foram medidos a fim de manter a proporção estabelecida. As soluções foram, então, adicionadas às soluções dos polímeros e mantidas em banho de gelo sob agitação, em agitador angular oscilatório modelo RM-3 (Premiere), durante os tempos de 2 e 12 h a fim de avaliar como o tempo de contato influenciaria na adsorção para os variados tamanhos de partículas. Na sequência, estas foram centrifugadas duas vezes (14.000 rpm, 4 °C, 25 min), em equipamento modelo 5430 R (Eppendorf), para a remoção do excesso de polímero, sendo o sobrenadante empregado para a medição indireta da concentração de PEG adsorvido, por meio da quantificação dos grupos sulfidrílicos em solução. Por último, os precipitados foram ressuspensos, vedados com plástico filme e armazenados a 4°C. A representação esquemática da metodologia empregada nesta etapa pode ser observada na Figura 22.

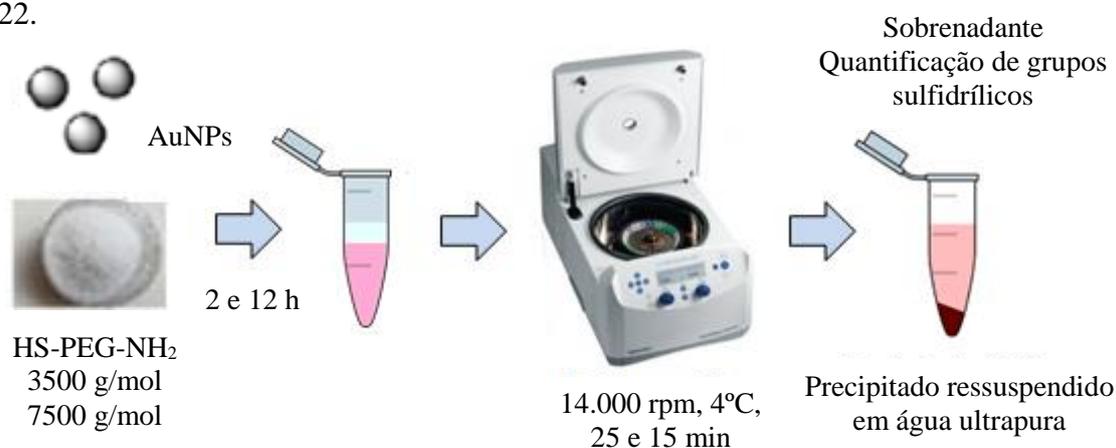


Figura 22. Representação esquemática da metodologia empregada na terceira etapa da estabilização das soluções de nanopartículas de ouro com HS-PEG-NH₂ 3500 e 7500 g/mol

4.3.2 Quantificação de grupos sulfidrílicos em solução

4.3.2.1 Método colorimétrico

Três soluções foram preparadas para esta técnica, sendo estas: 1) tampão de reação contendo 0,1 mol/L de fosfato de sódio bibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 1 mmol/L de EDTA dissódico dihidratado ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o pH desta solução foi ajustado para 8,0; 2) solução com concentração de 4 mg/mL de DNTB solubilizada no tampão e; 3) reagente I, composto pela diluição da solução 2 na proporção de 1:50 no tampão de reação (solução 1).

Inicialmente, 230 μL do reagente I (solução 3) foram adicionados a eppendorfs de 600 μL , seguido pela adição de 25 μL dos sobrenadantes a serem analisados. As soluções resultantes foram então homogeneizadas com o auxílio de um agitador de tubos de ensaio e incubados durante 15 min à temperatura ambiente e mantidas sob agitação. Após esse tempo, 200 μL das soluções foram transferidos para placas de 96 poços e lidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm, Figura 23.

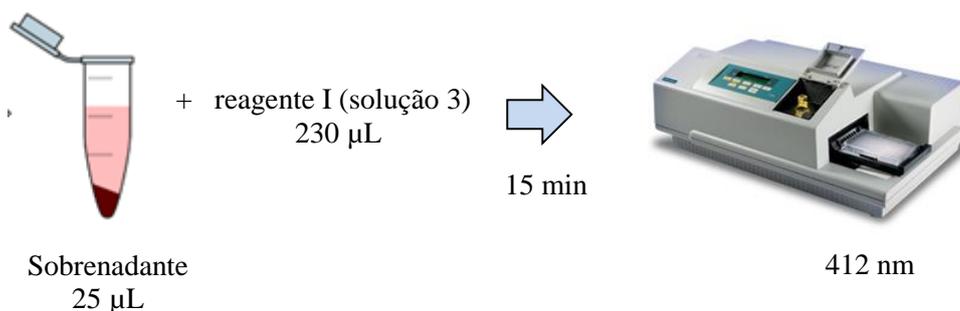


Figura 23. Representação esquemática da metodologia empregada no método colorimétrico para a quantificação de grupos sulfidrílicos adsorvidos pelas nanopartículas de ouro estabilizadas com HS-PEG-NH₂ 3500 e 7500 g/mol

A estabilidade do método foi avaliada a partir da construção de curvas de calibração em três diferentes dias. Essas foram elaboradas para as concentrações de 0,5, 1, 2,5, 3, e 5 mg/mL para o HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e 1, 2, 3, 4 e 5 mg/mL para o HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol. Os coeficientes de determinação para as triplicatas das curvas de ambos os polímeros foram satisfatórios, uma vez que variaram entre 0,995 e 0,999 para os diferentes dias em que as amostras foram analisadas.

4.3.2.2 Método cromatográfico

O método cromatográfico empregado foi desenvolvido por Schott (2005), a qual o utiliza para a quantificação de glutathiona reduzida em eritrócitos humanos e este foi adaptado para as soluções contendo PEG tiolado, sofrendo alterações em parâmetros como composição da fase móvel, vazão e tempo de análise para cada uma das amostras.

Quatro soluções foram preparadas para esta técnica, sendo estas: 1) hidroximetilaminometano (Tris base) 0,5 mol/L, o pH desta solução foi ajustado para 8,9; 2) ácido fosfórico 7 mol/L e; 3) fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 0,5 mol/L, o pH desta foi ajustado para 8, solução na qual o derivatizante (DTNB) foi solubilizado a fim de se obter a solução 4) contendo 10 mmol/L deste.

Inicialmente, 130 μ L das amostras foram adicionados a eppendorfs de 1500 μ L contendo 500 μ L da solução de Tris base, seguido pela adição de 350 μ L da solução de DTNB. As soluções foram então homogeneizadas com o auxílio de um agitador de tubos vórtex (modelo NI 1058, marca Nova Blue Line) por 1 min e deixadas em repouso por 5 min. Na sequência, 100 μ L da solução de ácido fosfórico foi adicionado e as soluções resultantes foram homogeneizadas e centrifugadas a 6000 rpm por 10 min. Após esta etapa, as soluções foram transferidas para outros eppendorfs de 1500 μ L e esta última etapa foi repetida. Por último, as soluções foram filtradas em membranas de poliestersulfona de poro de 0,20 μ m e analisadas no cromatógrafo.

As análises para a quantificação de grupos sulfidrílicos em solução foram realizadas em equipamento HPLC marca HP modelo 1100, coluna Primesphere 5 C18 HC (250 x 4,60mm x 5 μ m) equipado com detector UV a 330 nm e sistema quaternário de bombas. O sistema de bombeamento da fase móvel foi gradiente, a temperatura foi mantida em 39 °C e a alça de amostragem foi de 20 μ L. A representação esquemática da metodologia empregada pode ser observada na Figura 24. Os tempos de retenção para as soluções padrão de ambos os polímeros e para as amostras reais variaram entre 2 e 5 min.

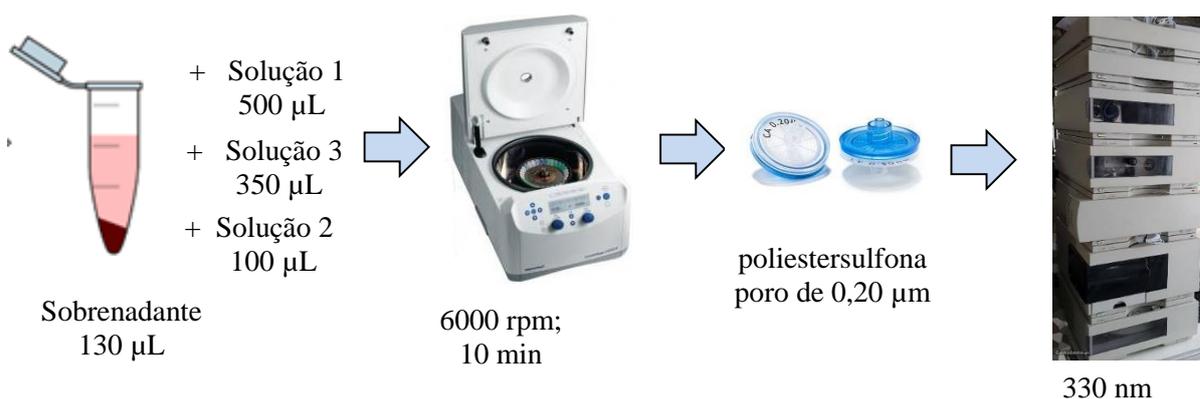


Figura 24. Representação esquemática da metodologia empregada no método cromatográfico para a quantificação de grupos sulfidrílicos adsorvidos pelas nanopartículas de ouro estabilizadas com HS-PEG-NH₂ 3500 e 7500 g/mol

O método desenvolvido por Schott (2005) pode ser observado na Tabela 4, enquanto que o método adaptado, o qual utiliza fase reversa constituída de solvente A – Água ultrapura e solvente B – Metanol pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 4. Programação de eluição desenvolvida por Schott (2005).

	Vazão (mL/minuto)	KH ₂ PO ₄ (%)	MeOH (%)
00:00	1,0	88	12
03:00	1,0	88	12
03:01	0,6	92	8
04:30	0,8	92	8
04:31	0,8	60	40
10:30	0,8	60	40
10:31	1,0	88	12
25:00	1,0	88	12

Tabela 5. Programação de eluição adaptada para a presente dissertação.

	Vazão	Água ultrapura	MeOH (%)
00:00	1,0	88	12
03:00	1,0	88	12
03:01	0,8	92	8
04:30	0,8	92	8
04:31	0,5	60	40
18:00	1,0	60	40
18:01	1,0	88	12
20:00	1,0	88	12

Assim como no método descrito anteriormente, a estabilidade deste foi avaliada da mesma forma, ou seja, foram elaboradas curvas de calibração para ambos os polímeros com concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2,5 e 5 mg/mL e estas foram analisadas em 3 diferentes dias. Os coeficientes de determinação para as triplicatas das curvas de ambos os polímeros também foram satisfatórios, uma vez que para este método variaram entre 0,982 e 0,999 para os diferentes dias em que as amostras foram analisadas.

4.3.3 Cinéticas de adsorção e modelagens matemáticas

A medição indireta da adsorção do HS-PEG-NH₂ de pesos moleculares 3500 e 7500 g/mol sobre as superfícies das nanopartículas de diferentes tamanhos foi realizada a partir da análise dos sobrenadantes de três amostras - em triplicata - mediante o uso do método colorimétrico devido a sua rapidez e simplicidade.

Após a definição das concentrações ótimas, este teste também verificou a presença e a espessura do filme polimérico adsorvido sobre a superfície das nanopartículas através das técnicas de MEV/FEG e MET e do software *Image J*, a dispersão e a estabilidade pelas técnicas de DLS e potencial zeta. Além disso, foi possível desenvolver - para as nanopartículas de 20, 40 e 80 nm - modelos matemáticos e equações utilizando a ferramenta *Curve Fitting* do software Matlab. Tanto os modelos quanto as equações visaram a elaboração de uma correlação entre as concentrações iniciais de PEG e as concentrações adsorvidas pelas nanopartículas em função do tamanho da cadeia polimérica. Entretanto, uma vez que a elaboração da equação que previsse o comportamento das nanopartículas de 20 nm não foi possível, para as etapas seguintes este tamanho de nanopartícula foi descartado.

4.4 ESTRATÉGIAS DE FUNCIONALIZAÇÃO

A formação das camadas auto-organizáveis sobre a superfície das nanopartículas foi adaptada de Menti *et al.* (2017) para a etapa 4, no qual uma estratégia semelhante foi utilizada para modificar a superfície de um sensor magneto-elástico para a captura da bactéria *Staphylococcus aureus*.

Inicialmente, as soluções contendo partículas de 40 e 80 nm de diâmetro foram estabilizadas durante 2 e 12 h com as concentrações ótimas de HS-PEG-NH₂ 3500 e

HS-PEG-NH₂ 7500, definidas na etapa 3, a fim de avaliar a influência do tempo de estabilização sobre a captura da HRP. Após esta etapa, as soluções resultantes foram submetidas a quatro diferentes estratégias de funcionalização e avaliadas frente à captura. Uma representação esquemática das estratégias utilizadas pode ser observada na Figura 25.

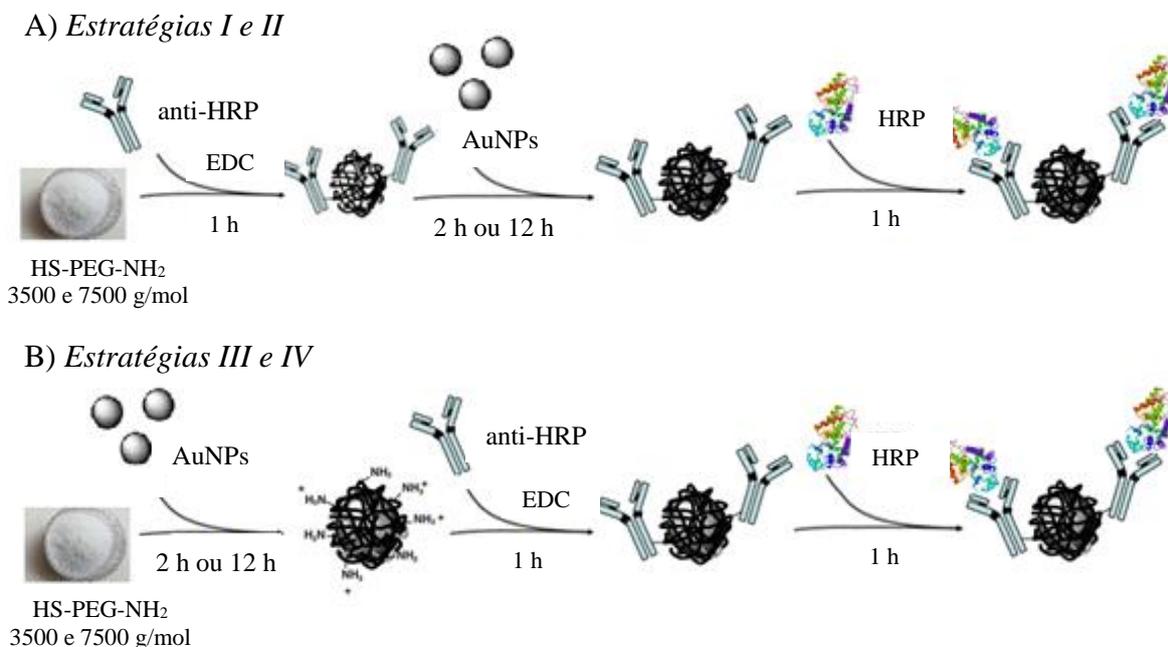


Figura 25. Representação esquemática das etapas realizadas para as estratégias de funcionalização das soluções de nanopartículas de ouro. A) Estratégias I e II; B) Estratégias III e IV.

Estratégias I e II: uma solução de anticorpos anti-HRP (Sigma Aldrich) diluídos na razão 1:500 (v/v) em PBS (0,1 mol/L, pH 7,4) foi ativada através do uso de uma solução 4 mg/mL do agente de reticulação 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) na proporção de 1:100 (v/v) durante 15 min à temperatura ambiente. 500 µL desta solução foi misturada com 500 µL da solução de HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol (*Estratégia I*) e HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol (*Estratégia II*), de concentrações definidas anteriormente, e mantida em contato em banho de gelo por 1 h. Após esta etapa, às soluções foi adicionado um volume de nanopartículas de ouro previamente lavadas, mantendo-se a proporção baseada na área superficial total de cada uma das soluções de AuNPs, e esta foi mantida sob agitação em agitador angular oscilatório modelo RM-3 (Premiere) durante 2 e 12 h em banho de gelo para a estabilização das partículas em solução. Na sequência estas foram submetidas a duas etapas de centrifugação (14.000 rpm, 4 °C, 25 min) em equipamento modelo 5430 R (Eppendorf), nas quais os sobrenadantes foram armazenados para análise indireta da adsorção do polímero. Os precipitados da segunda

centrifugação foram ressuspensos com 100 µL de água ultrapura e a absorbância das soluções foi medida, a fim de verificar quantos µg/mL de ouro estavam presentes, uma vez que a quantidade de 1 µg/mL foi definida como padrão para os testes (NGHIEM *et al.*, 2010; CIAURRIZ *et al.*, 2017; KOSAKA, *et al.*, 2017). Por último, as soluções foram postas em contato durante 1 h com soluções contendo 30, 50, 100 e 200 ng/mL do antígeno de interesse (HRP). Estas passaram por nova etapa de centrifugação, nas quais os sobrenadantes foram recolhidos para a medição indireta da captura do antígeno pelas nanopartículas de ouro.

Estratégia III e IV: após a estabilização das nanopartículas com a solução de HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol (*Estratégia III*) e HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol (*Estratégia IV*) durante 2 e 12 h, as amostras foram submetidas a duas centrifugações (14.000 rpm, 4 °C, 25 min) em equipamento modelo 5430 R (Eppendorf) e os sobrenadantes foram guardados para posterior análise da quantidade de grupos sulfidrílicos em solução. Na sequência anticorpos anti-HRP (Sigma Aldrich) foram diluídos na razão 1:500 em PBS (0,1 mol/L, pH 7,4) e os grupamentos carboxila presentes na região Fc foram ativados através do uso de uma solução 4 mg/mL do agente de reticulação 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) na proporção de 1:100 durante 15 min à temperatura ambiente. 500 µL da solução de anticorpos previamente ativados foi utilizada para ressuspender o precipitado da segunda centrifugação da solução de nanopartículas e as soluções resultante foram mantidas sob agitação, em agitador angular oscilatório modelo RM-3 (Premiere), em banho de gelo, durante 1 h. Após esse tempo, as soluções foram novamente centrifugadas (14.000 rpm, 4 °C, 15 min) em equipamento modelo 5430 R (Eppendorf) e os precipitados da segunda centrifugação foram ressuspensos com 100 µL de água ultrapura e foram seguidos os mesmos procedimentos descritos na Estratégia I.

4.4.1 Captura da enzima HRP para as diferentes estratégias de funcionalização

O método consistiu no preparo de cinco soluções: 1) KH₂PO₄ 40 mmol/L com 0,25% (m/v) de albumina de soro bovino e 0,5% (v/v) de triton X-100, pH 6,8; 2) solução mãe de HRP 10 mg/mL solubilizada na solução 1; 3) tampão fosfato de monobásico potássio (KH₂PO₄) 100 mmol/L, pH ajustado para 5,0 com KOH 1 mol/L; 4) ABTS 9,1 mmol/L preparada no tampão fosfato; e 5) peróxido de hidrogênio 0,3% (m/m).

O procedimento experimental baseou-se em preparar quatro soluções de HRP, com

concentrações de 30, 50, 100 e 200 ng/mL a partir da solução 2 diluída na solução 1 a fim de se obter uma curva padrão para as análises.

Para a análise das soluções comerciais sem funcionalização (padrões) e dos sobrenadantes das variadas estratégias de funcionalização, foram utilizados 116 μL da solução 4, 2 μL dos sobrenadantes e 4 μL da solução 5. Estas foram preparadas diretamente em placas de 96 poços e analisadas durante 1 h em espectrofotômetro, modelo Spectramax M2e (Molecular Devices), monitorando o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) em 405 nm. As cinéticas enzimáticas foram acompanhadas de 3 em 3 min durante o período do teste (Figura 26). Os resultados obtidos nesta etapa foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc de Tukey, com intervalo de confiança de 95% a fim de verificar diferenças significativas na captura da enzima proporcionada pelas quatro estratégias de funcionalização.

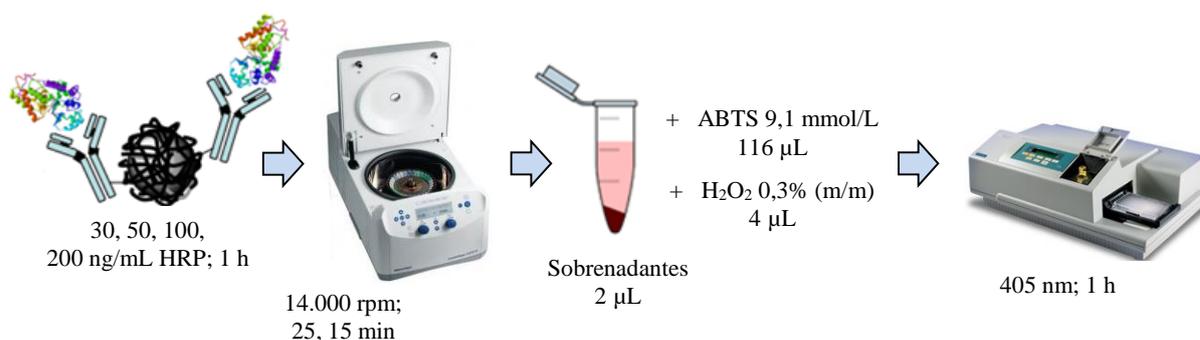


Figura 26. Representação esquemática da metodologia realizada para a avaliação da captura da enzima horseradish peroxidase pelas nanopartículas de ouro funcionalizadas pelas quatro diferentes estratégias de funcionalização.

4.4.2 Estabilidade e aplicação das estratégias de funcionalização em teste de diagnóstico viral

Na etapa 5, a fim de avaliar a estabilidade das diferentes estratégias, as amostras funcionalizadas durante 2 h foram submetidas a novos testes de captura da enzima HRP (Figura 26) em diferentes meses e os resultados foram comparados aos obtidos anteriormente. As concentrações de 30, 50, 100 e 200 ng/mL de enzima foram mantidas e as concentrações capturadas por cada uma das estratégias foram comparadas com os testes dos meses anteriores.

Após a verificação da estratégia mais promissora levando-se em consideração à dispersão, à captura e à eficiência de captura frente o tempo de armazenagem, na etapa 6 esta foi empregada em testes comerciais baseados na detecção qualitativa de anticorpos para o vírus

da hepatite C e da AIDS em soro ou plasma humano (Bioclin Biolisa HCV e Bioclin Biolisa HIV), visando a melhora na sensibilidade dos dispositivos já comercializados, assim como representado na Figura 27.

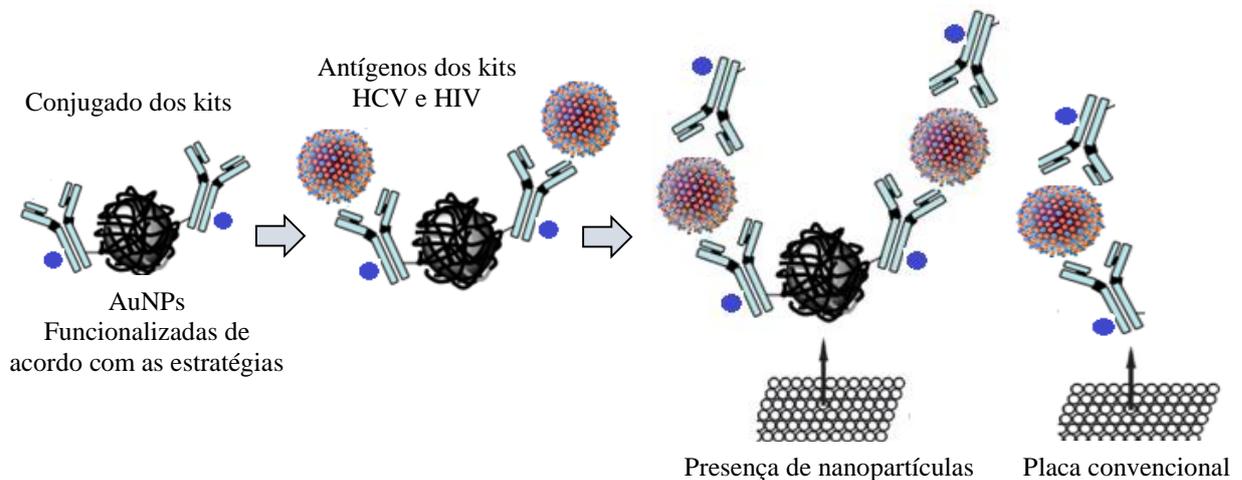


Figura 27. Representação esquemática da metodologia empregada para a aplicação das diferentes estratégias de funcionalização das nanopartículas de ouro nos testes de diagnóstico viral.

Inicialmente, as soluções coloidais de 40 nm foram funcionalizadas seguindo a metodologia da estratégia I e II para o tempo de 2 h. Para o kit de diagnóstico da hepatite C, o conjugado, denominado no kit como solução R2, foi diluído na razão 1:21 no diluente do conjugado (solução R4). As soluções passaram por duas etapas de centrifugação, foram ressuspensas em 100 μL de água ultrapura e a elas foram adicionados 100 μL das soluções do controle positivo diluídos em água ultrapura nas razões de 1:100, 1:1000, 1:10.000 e 1:100.000 e mantidas a 37°C sob agitação durante 1 h. Após esse período, as soluções de nanopartículas funcionalizadas e conjugadas ao controle positivo foram submetidas a duas etapas de lavagem e ressuspensas em água ultrapura.

Já na placa fornecida pelo kit, foram adicionados 100 μL das soluções resultantes e estas foram mantidas a 37°C sob agitação durante 1 h. Na sequência, cada um dos poços da placa foi lavado e 100 μL do conjugado previamente diluído foram adicionados - a fim de finalizar a estrutura do sanduíche de funcionalização - e mantidos a 37°C sob agitação durante 1 h. Por último, cada um dos poços foi novamente lavado e a eles foram adicionadas as soluções denominadas pelo fabricante como substratos A e B - mantidos a 37°C sob agitação durante 15 min - e a solução de parada. Estes foram então lidos em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 450 e 630 nm.

Para o kit de diagnóstico de HIV, a metodologia empregada foi semelhante a do kit de

diagnóstico da hepatite C, entretanto para esse não foi necessário diluir o conjugado. As soluções passaram por duas etapas de centrifugação, foram ressuspensas em 100 μ L de água ultrapura e a elas foram adicionados 100 μ L das soluções do controle positivo diluídos, no diluente de amostras fornecido no kit, nas razões de 1:100, 1:1000, 1:10.000 e 1:100.000 e mantidas a 37°C sob agitação durante 1 h. Após esse período, as soluções de nanopartículas funcionalizadas e conjugadas ao controle positivo foram submetidas a duas etapas de lavagem e ressuspensas em água ultrapura.

Assim como no kit anterior, na placa foram adicionados 100 μ L das soluções resultantes e estas foram mantidas a 37°C sob agitação durante 1 h. Na sequência, cada um dos poços da placa foi lavado e 100 μ L do conjugado previamente diluído foram adicionados e mantidos a 37°C sob agitação durante 30 min. Por último, cada um dos poços foi novamente lavado e a eles foram adicionados tanto os substratos A e B – mantidos a 37°C sob agitação durante 30 min – e a solução de parada. Estes foram então lidos em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 450 e 630 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados avaliam a influência de fatores como o uso de agentes estabilizantes, polímeros heterobifuncionais e estratégias de funcionalização diferenciadas frente à dispersão, formação de aglomerados e eficácia de captura da enzima horseradish peroxidase. Os experimentos focam a obtenção de uma estratégia viável para a captura do Zika vírus nas etapas futuras do projeto em que este plano está inserido. Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados referentes às diferentes etapas demonstradas na Figura 28.

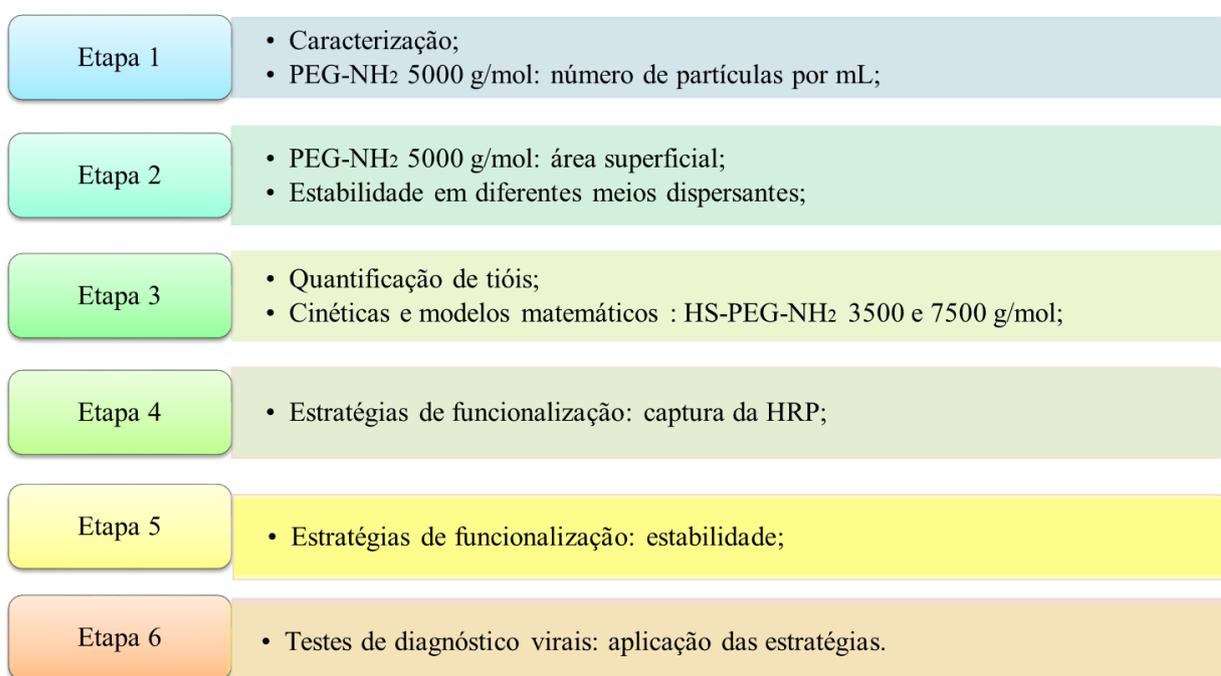


Figura 28. Esquemática das etapas empregadas para a estabilização e funcionalização das nanopartículas de ouro, a captura da horseradish peroxidase e implementação das estratégias de funcionalização nos kits de diagnóstico virais.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

A primeira etapa do presente trabalho caracterizou as soluções coloidais de AuNPs, visando à comparação entre as informações fornecidas pelo fornecedor e as obtidas experimentalmente, como os comprimentos de onda máximo (λ_{\max}) e os diâmetros das AuNPs, Tabela 6. Esses parâmetros puderam ser observados, uma vez que as nanopartículas apresentam comprimentos de onda máximo característicos, variando entre 520 nm – para as nanopartículas

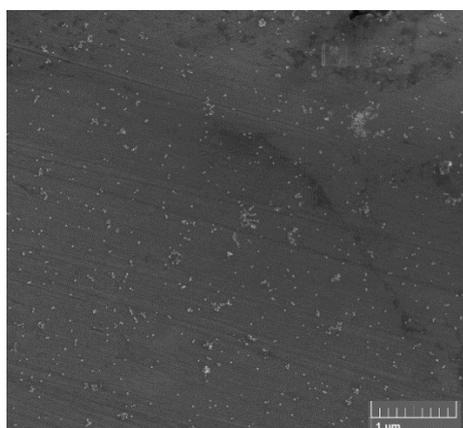
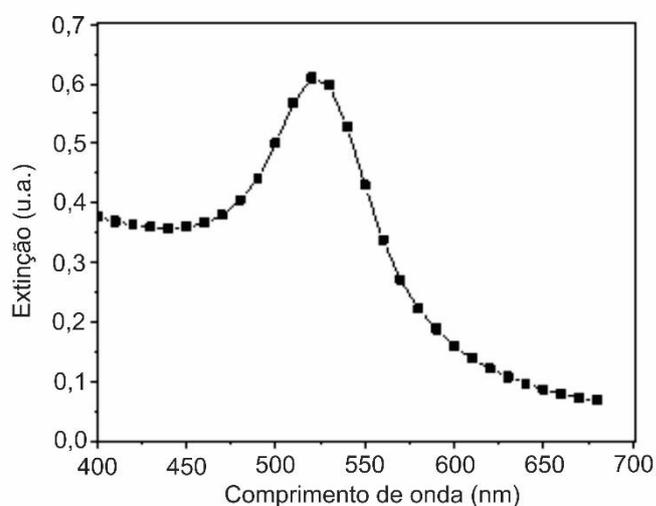
de 20 nm - e 550 nm – para as de 80 nm – entretanto na presença de aglomerados estes são deslocadas (KUMAR; AARON; SOKOLOV, 2008). Já para a verificação dos diâmetros das AuNPs, através da técnica de MEV-FEG, foram medidas as dimensões de um total de 20 nanopartículas para cada uma das soluções de AuNPs.

Tabela 6. Informações fornecidas pela Sigma-Aldrich para cada uma das soluções coloidais de AuNPs (Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com>> Acessado em jan. 2019.)

Diâmetro das AuNPs (nm)	Diâmetro experimental das AuNPs (nm)	Concentração das AuNPs (partículas/mL)	λ_{\max} (nm)	λ_{\max} experimental (nm)
20	$17,3 - 21,5 \pm 1,49$	$6,54 \times 10^{11}$	518-522	520
40	$35,8 - 42,7 \pm 2,97$	$7,2 \times 10^{10}$	529-533	530
80	$74,1 - 101,4 \pm 10,69$	$7,8 \times 10^9$	551-557	550

Os λ_{\max} foram confirmados por meio da aquisição dos espectros de extinção (absorção e espalhamento) na região do visível das soluções coloidais de AuNPs, (Figuras 29 A-C). Além disso, como pode ser observado na mesma figura pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, a presença de aglomerados foi evidenciada nas três soluções coloidais de AuNPs. Sendo assim, nas etapas 1, 2 e 3, visou-se minimizar a quantidade desses aglomerados através da estabilização das nanopartículas através de diferentes variedades de PEG.

A



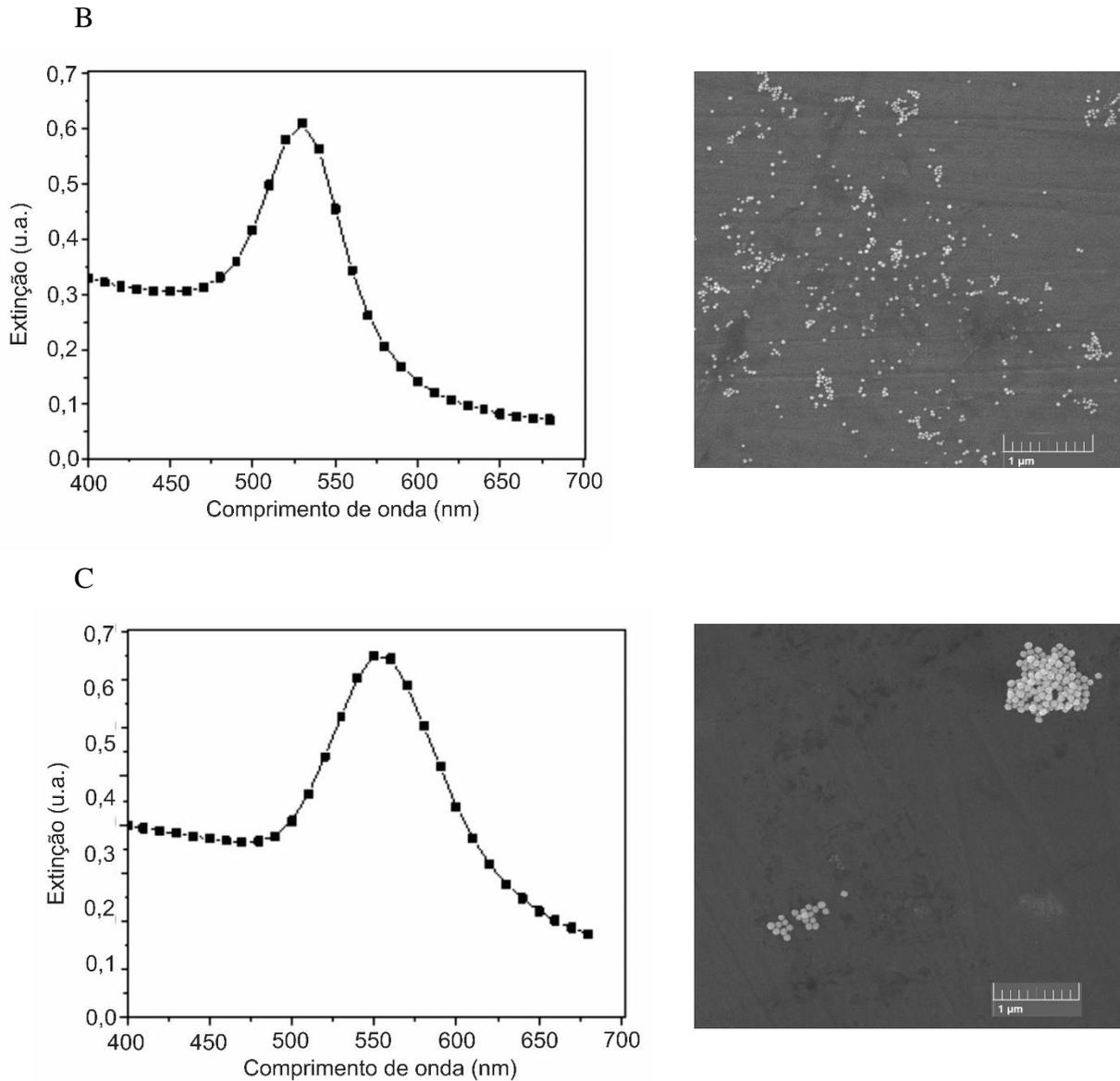


Figura 29. Espectros de absorção e imagens de MEV-FEG das soluções coloidais de nanopartículas de ouro de A) 20 nm, B) 40 nm, C) 80 nm.

5.2 ESTABILIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

5.2.1 Uso de polietilenoglicol amino terminal para a modificação das superfícies das nanopartículas em solução

Seguindo o protocolo de estabilização apresentado por Ling, Jiang, Zhang, (2013) descrito na página 49, a etapa 1 teve como objetivo avaliar a forma como a estabilização baseada na proporção entre o número de partículas/mL e a concentração de PEG-NH₂ 5000 g/mol

influenciaria no diâmetro médio das nanopartículas de ouro em solução.

Na Tabela 7 são apresentados os parâmetros o volume de cada uma das soluções coloidais de AuNPs, após estas serem diluídas na razão 1:10 (v/v), além da concentração e o volume de PEG-NH₂ empregado nesta etapa.

Tabela 7. Relação entre número de partículas/mL e concentração de PEG-NH₂ 5000 utilizada na etapa 1 (adaptado de LING; JIANG; ZHANG, 2013).

Tamanho das AuNPs (nm)	Volume solução de AuNPs (mL)	Concentração de PEG-NH ₂ 5000 (µg/mL)	Volume solução PEG-NH ₂ 5000 (mL)
20	0,20	1000	0,60
40	0,20	100	0,60
80	0,20	10	0,60

Por meio da técnica de DLS, o diâmetro médio das nanopartículas de ouro antes e após a estabilização foi medido, sendo estes apresentados na Tabela 8. Para isso foram verificadas as dimensões de uma amostragem de 300 AuNPs.

Tabela 8. Diâmetros médios para as soluções coloidais de AuNPs antes e após a estabilização realizada durante a primeira etapa.

Tamanho das AuNPs (nm)	Concentração de PEG-NH ₂ (µg/mL)	Diâmetro antes da estabilização (nm)	Diâmetro após a estabilização (nm)
20	1000	166,21 ± 48,38	91,65 ± 15,91
40	100	149,93 ± 31,91	133,95 ± 36,76
80	10	119,92 ± 41,96	138,45 ± 48,96

De modo geral, observou-se que apenas para a solução contendo partículas com diâmetro de 20 nm, na qual foi utilizada a concentração de 1000 µg/mL houve redução significativa do diâmetro dos aglomerados, passando de 166,21 ± 48,38 nm para 91,65 ± 15,91 nm. Este caso pode estar relacionado com o fato das concentrações de 100 e 10 µg/mL serem insuficientes para a estabilização das soluções com partículas de 40 e 80 nm de diâmetro, apesar da proporção desenvolvida por Ling, Jiang, Zhang, (2013), descrito na página 49, ter sido mantida. Sendo assim, para a etapa 2 e as demais na sequência, a estratégia de estabilização foi adaptada, baseando-se na área superficial total de cada uma das soluções coloidais.

Para o cálculo das áreas superficiais totais, empregada para a etapa 2 e as demais na

sequência, foi necessária a aproximação da geometria das nanopartículas com esferas, equação 4.

$$A_{sup} = 4\pi r^2 * N_{p/mL} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

A_{sup} – Área superficial total (m²/mL)

r – Raio da nanopartícula (m)

$N_{p/mL}$ – Número de nanopartículas por mL (partículas/mL)

Após o cálculo da área superficial total, as proporções entre os volumes de cada uma das soluções coloidais e de PEG foram recalculadas, sendo estas apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Relação entre as áreas superficiais das nanopartículas que compõem as soluções coloidais e as proporções entre os volumes das soluções de nanopartículas e PEG-NH₂ 5000 (adaptado de LING; JIANG; ZHANG, 2013).

Tamanho das AuNPs (nm)	Área superficial (m ² /mL)	Volume solução nanop. (mL)	Volume PEG (mL)
20	8,21x10 ⁻⁴	0,102	0,50
40	3,60x10 ⁻⁴	0,230	0,50
80	1,57x10 ⁻⁴	0,528	0,50

Na etapa 2, a fim de avaliar o melhor meio dispersante, as três soluções coloidais de nanopartículas de ouro foram estabilizadas com PEG amino terminal (1000 µg/mL) e mantidas em água ultrapura, soluções de citrato de sódio (38,8 mmol/L), cloreto de sódio (0,05 mmol/L), tampão fosfato de sódio (PBS) (0,1 mol/L, pH 7,4) e polietilenoglicol amino terminal 5000 g/mol (1000 µg/mL). A estabilidade das soluções resultantes foi avaliada por meio da medição dos valores de extinção destas durante os tempos 0; 2,5; 5,5; 8,5; 12; 24 e 48 h, este último apenas para as condições que se mantiveram estáveis no período de 24 h (Figura 30 A-C).

Os meios e os tempos avaliados foram escolhidos a partir de estudos como os desenvolvidos por Manson, Kumar e Meenan (2011) e por Wang *et al.* (2014). No primeiro, os autores avaliaram a estabilidade de soluções de AuNPs funcionalizadas com diferentes concentrações de PEG tiolado - de massa molar 5000 g/mol - em meios como água ultrapura, solução salina tamponada com fosfato (PBS), solução salina tamponada com fosfato contendo albumina de soro bovino (PBS/BSA) e diclorometano (DCM). Uma relação linear foi observada

entre a concentração de PEG utilizada e a estabilidade em água e em DCM, diferentemente do comportamento em PBS e PBS/BSA. Enquanto que no segundo, os autores avaliaram a influência de soluções tamponadas em diferentes pH (4, 7, 8 e 10), água ultrapura e PBS sobre a estabilidade de AuNPs sintetizadas com os agentes redutores citrato de sódio e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). De acordo com os autores, ambas as soluções coloidais sintetizadas se mantiveram estáveis em água ultrapura e em PBS durante todo o período de testes (168 h).

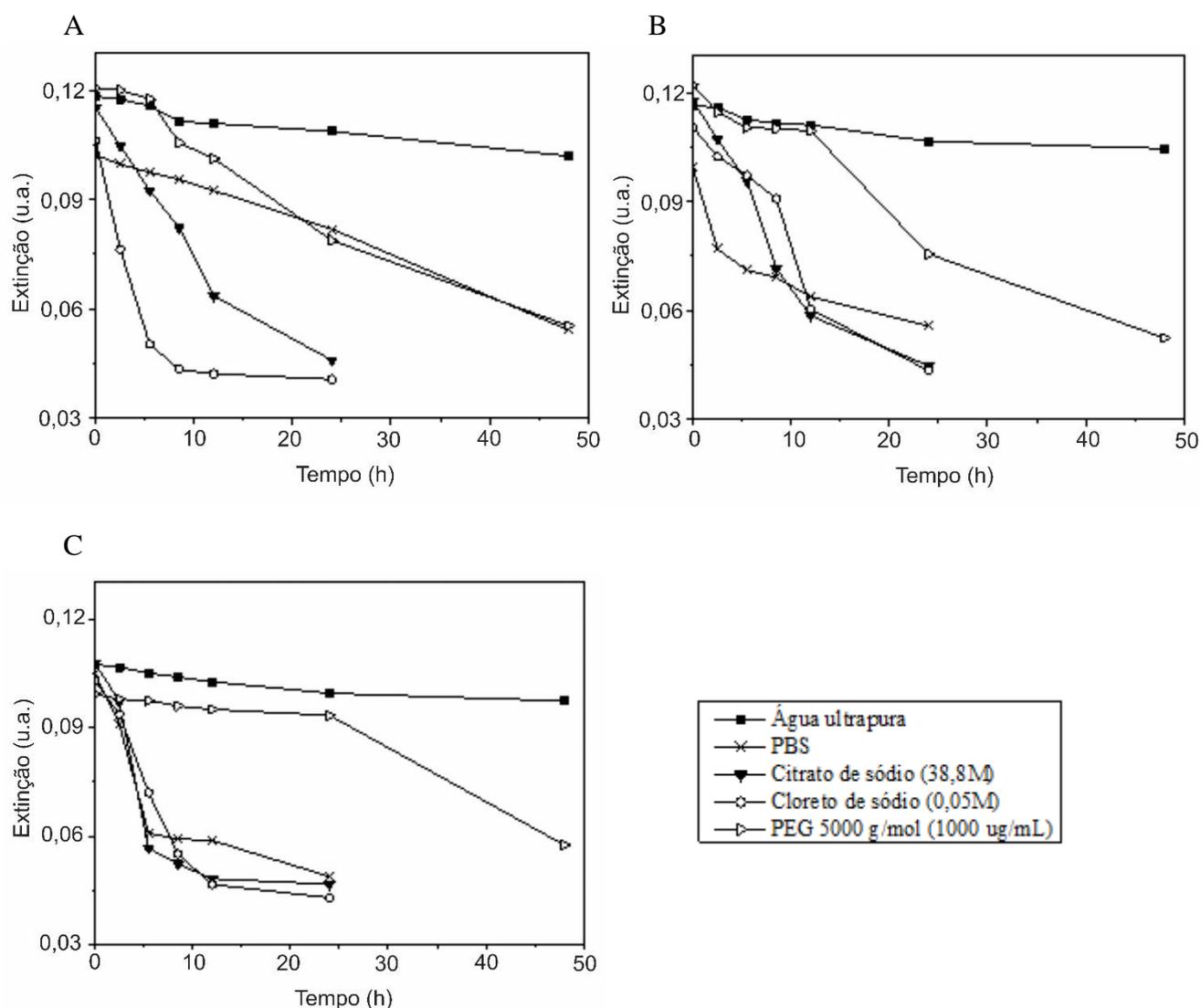


Figura 30. Estabilidade óptica medida para as soluções com nanopartículas de 20 nm (A), 40 nm (B) e 80 nm (C) em diferentes meios dispersantes.

Na Figura 30, observou-se que independentemente do diâmetro das partículas em solução, o meio dispersante em que a absorvância destas se manteve e, portanto, o meio em que as nanopartículas se mantiveram estáveis por mais tempo, foi o meio composto por água ultrapura, assim como observado nos estudos desenvolvidos por Manson, Kumar e Meenan (2011) e Wang *et al.* (2014).

Foram realizadas imagens, a partir da técnica de MEV/FEG, dos padrões de 20, 40 e 80 nm nos tempos de 0; 12 e 24 h de contato com o meio dispersante enquanto que as soluções modificadas foram avaliadas apenas para os tempos de 12 e 24 h, período em que os demais meios avaliados ocasionam a perda da estabilidade das soluções de AuNPs modificadas, diferentemente do comportamento observado para a água ultrapura.

As imagens obtidas tanto para os padrões quanto para as soluções modificadas, podem ser observadas nas Figuras 31 e 32 - aumento de 50.000 vezes – na Figura 33 - aumento de 20.000 vezes.

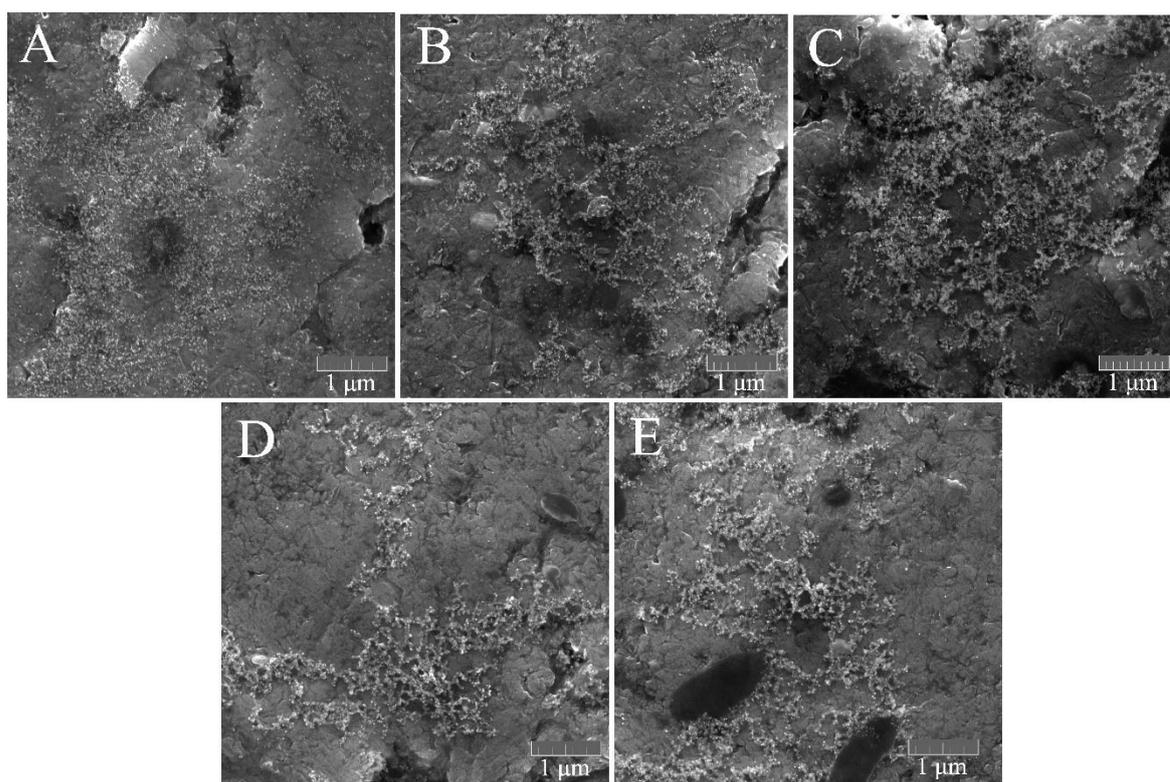


Figura 31. Nanopartículas de 20 nm: A) controle, B) tempo 12 h, C) tempo 24 h; Modificadas com PEG-NH₂ 5000 g/mol, D) tempo 12 h, E) tempo 24 h.

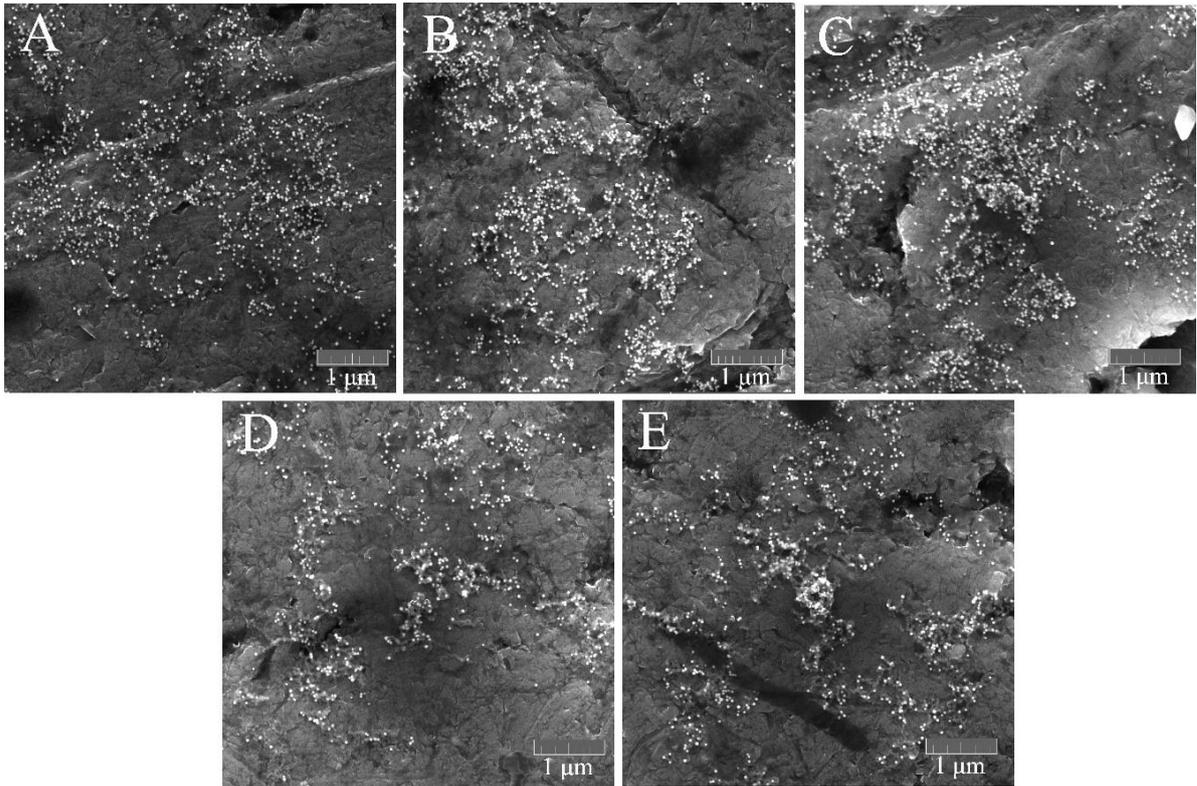


Figura 32. Nanopartículas de 40 nm, A) controle, B) tempo 12 h, C) tempo 24 h; Modificadas com PEG-NH₂ 5000 g/mol, D) tempo 12 h, E) tempo 24 h.

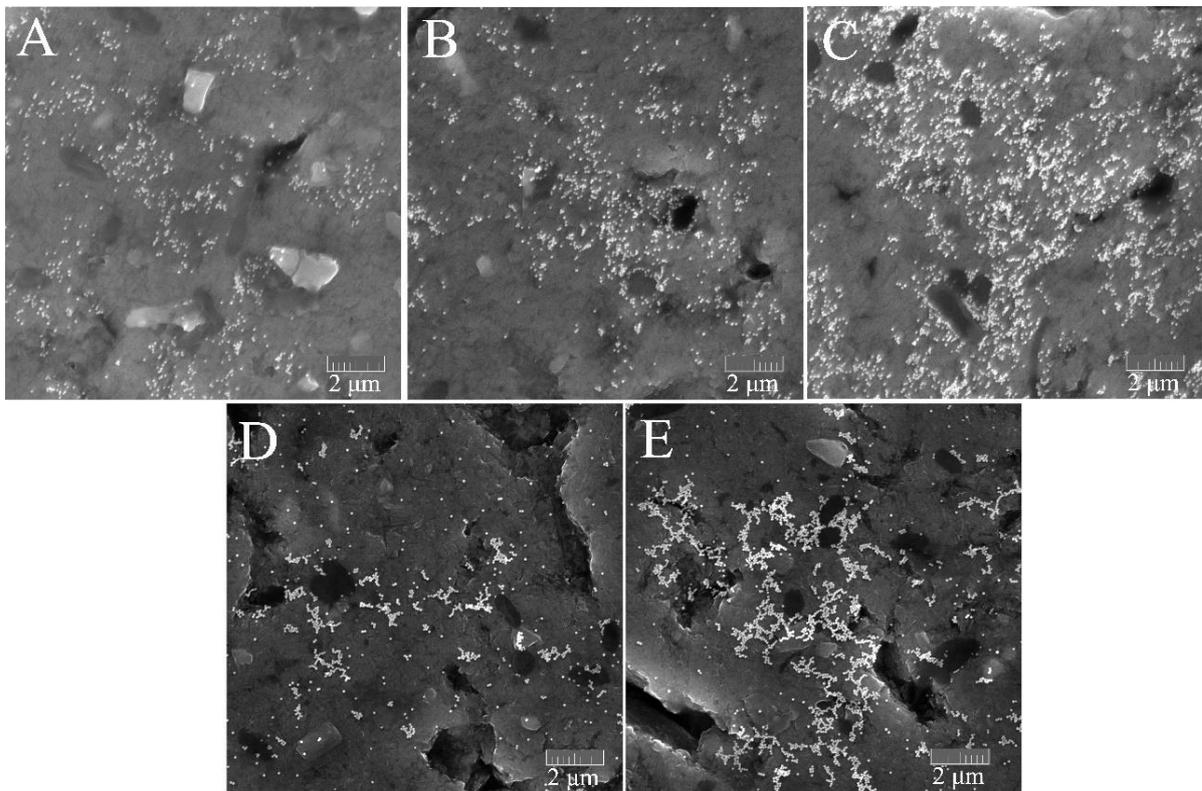


Figura 33. Nanopartículas de 80 nm, A) controle, B) tempo 12 h, C) tempo 24 h; Modificadas com PEG-NH₂ 5000 g/mol, D) tempo 12 h, E) tempo 24 h.

A partir da análise das imagens, foi possível observar que houve a formação de aglomerados, tanto nos padrões quanto nas soluções modificadas, para todos os tamanhos de nanopartículas. Entretanto, quando se compara a dimensão e a quantidade dos aglomerados presentes, assim como a sobreposição das partículas, houve a redução dos três fatores nas soluções com partículas de 20 e 40 nm após a etapa de estabilização com 1000 µg/mL de PEG amino terminal. Entretanto, especialmente na solução coloidal de 80 nm modificada, foi observada a formação de aglomerados de grande extensão para ambos os tempos avaliados (Figuras 33 D e Figura 33 E).

Visto que o potencial zeta é uma técnica empregada para a avaliação da estabilidade de suspensões já que esse reflete a carga efetiva das partículas, a qual se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas. Quanto maior o potencial zeta, mais provável que a suspensão ser estável, visto que as partículas se repeliriam, superando a tendência à aglomeração.

Segundo Lu, Kessler (2006), o valor absoluto do potencial zeta deve ser superior a 25mV, para que o coloide seja considerado estabilizado. A Tabela 10 mostra os valores de potencial e a estabilidade correspondente considerados pelos autores. Entretanto, esses podem variar de autor para autor.

Tabela 10. Relação entre valores de potencial zeta e grau de agregação do coloide (adaptado de Lu, Kessler (2006)).

Potencial zeta (mV)	Agregação coloidal
$\geq \pm 30$	Pouca ou nenhuma
$\geq \pm 15 > \pm 30$	Agregação moderada
$< \pm 15$	Agregação severa

Sendo assim, a fim de complementar os resultados observados nas Figuras 31, 32 e 33, os diâmetros médios, de uma amostragem de 300 AuNPs e a estabilidade dos padrões, ou seja, das soluções que não passaram pela etapa de estabilização e das soluções modificadas para os tempos de 12 e 24 h de contato em água ultrapura foram medidos pelas técnicas de DLS e potencial zeta (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Diâmetros médios das soluções coloidais de AuNPs obtidos na segunda etapa.

Tamanho das AuNPs (nm)	Padrão 12 h de contato (nm)	Padrão 24 h de contato (nm)	Modificada 12 h de contato (nm)	Modificada 24 h de contato (nm)
20 nm	128,53 ± 48,38	175,06 ± 33,21	116,66 ± 45,47	91,65 ± 15,91
40 nm	149,93 ± 31,91	135,45 ± 43,26	167,18 ± 37,64	192,77 ± 51,00
80 nm	124,02 ± 32,78	119,37 ± 33,04	130,43 ± 48,96	125,57 ± 44,13

Tabela 12. Potencial zeta das soluções coloidais de AuNPs obtidas na segunda etapa

Tamanho das AuNPs (nm)	Padrão 12h de contato (mV)	Padrão 24h de contato (mV)	Modificada 12 h de contato (mV)	Modificada 24 h de contato (mV)
20 nm	-18,99 ± 4,42	-16,89 ± 3,38	-14,07 ± 4,59	-12,18 ± 2,66
40 nm	-13,43 ± 3,63	-12,61 ± 4,74	-13,97 ± 4,10	-9,09 ± 2,96
80 nm	-17,84 ± 4,22	-15,00 ± 4,74	-16,77 ± 3,86	-15,46 ± 4,21

Através da análise das Tabelas 11 e 12 foi possível observar que o diâmetro médio dos aglomerados foi maior na solução padrão de 20 nm, diferentemente dos demais padrões. Em relação às soluções modificadas, apesar de ter sido realizada a etapa de estabilização, houve o aumento do diâmetro dos aglomerados para as soluções de AuNPs de 40 e 80 nm. Esse evento provavelmente se deve à adsorção do PEG amino terminal sobre a superfície dos aglomerados, fato destacado pelo aumento do potencial zeta durante o período de 24 h (Tabela 12), indicando o recobrimento da superfície dos coloides (LIOPO *et al.* 2012). O mesmo tipo de comportamento também pôde ser observado para a solução modificada de 20 nm.

O valor maior do potencial zeta também pode ser observado para as soluções padrão quando em contato com a água ultrapura. Esse fato provavelmente está relacionado com a substituição das moléculas de citrato de sódio, agente responsável pela estabilidade das soluções, por moléculas de água (LIOPO *et al.* 2012; RIBEIRO, 2015).

Sendo assim, uma vez que não houve melhora significativa na dispersão das nanopartículas usando PEG-NH₂ 5000 g/mol, para a terceira etapa, dois polímeros de diferentes massas molares contendo grupamentos amino e tiol foram selecionados para os testes seguintes, devido à facilidade de formação da ligação forte entre o tiol e o ouro e também pela estabilidade dos bioconjugados destes. Os polímeros empregados consistem em variedades de polietilenoglicol modificado (HS-PEG-NH₂) de massas molares iguais a 3500 e 7500 g/mol.

5.3 USO DE POLIETILENOGLICOL HETEROFUNCIONAL PARA A MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

A etapa 3 visou-se estabelecer a cinética de adsorção, determinar as concentrações ótimas de ambos os polímeros para cada uma das soluções coloidais e elaborar modelos matemáticos por meio do software Matlab para as soluções contendo nanopartículas de 20, 40 e 80 nm.

5.3.1 Cinéticas de adsorção para as soluções coloidais de AuNPs modificadas com polietilenoglicol heterobifuncional

A terceira etapa foi iniciada com a solução coloidal contendo partículas de 20 nm e para esta foram avaliadas concentrações entre 0,25 a 5 mg/mL para o HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e entre 1,2 a 5 m/mL para o HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol. As concentrações adsorvidas foram estimadas nos tempos de 2 e 12 h pelo método clorimétrico, a fim de verificar a influência do tempo de ensaio sobre a adsorção e determinar o melhor tempo para as demais soluções coloidais (Figuras 34 A e B).

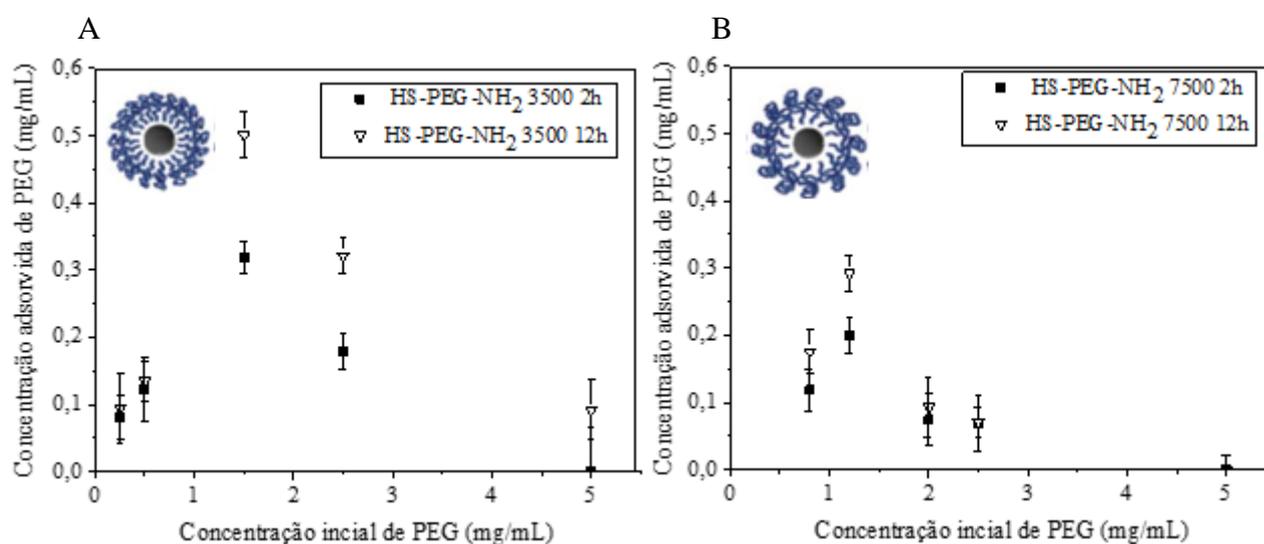


Figura 34. Cinéticas de adsorção para as partículas de 20 nm com HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol (A) e HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol (B).

O tempo de 2 h foi selecionado para as demais análises, uma vez que o aumento observado na adsorção não compensaria o tempo de ensaio prolongado. Sendo assim, as

cinéticas para as soluções contendo partículas de 20, 40 e 80 nm de diâmetro foi realizada apenas para o tempo de 2 h (Figuras 35 A-B e Figuras 36 A-B).

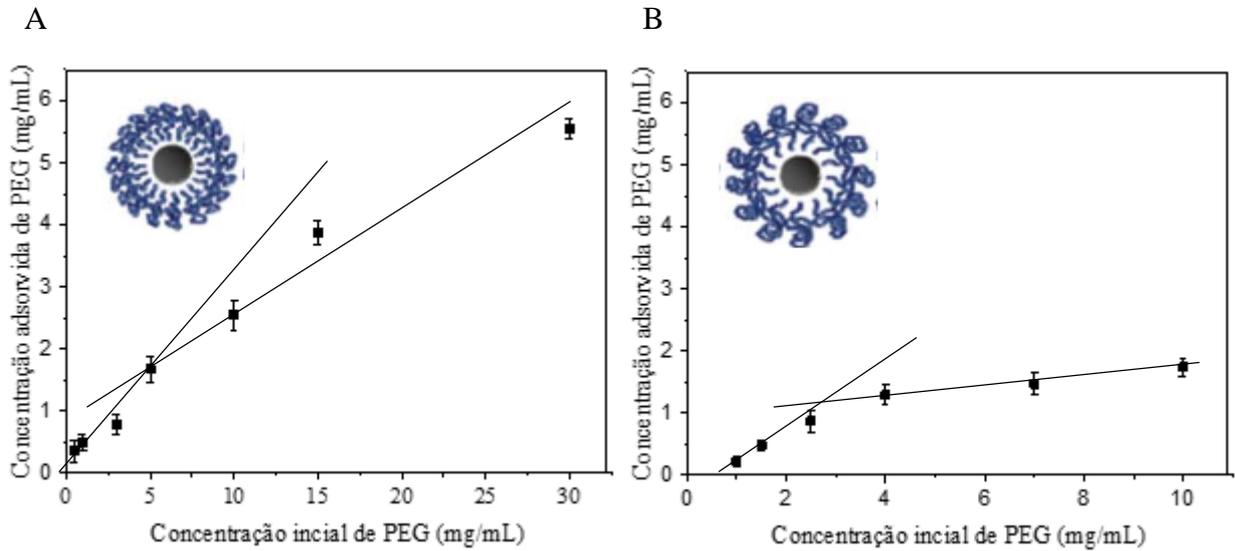


Figura 35. Cinéticas de adsorção para as partículas de 40 nm (A e B), onde: A) ■ 40 nm, HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol, 2 h; B) ■ 40 nm, HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol, 2 h.

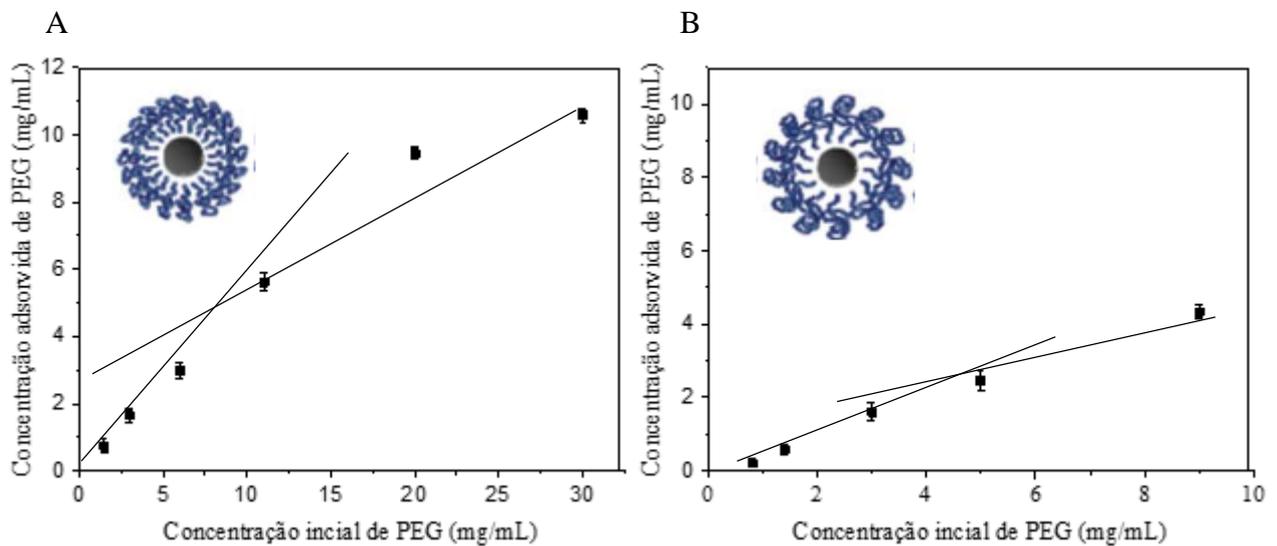


Figura 36. Cinéticas de adsorção para as partículas de 80 nm (A e B), onde: A) ■ 80 nm, HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol, 2 h; B) ■ 80 nm, HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol, 2 h.

A partir da análise das inclinações das retas desenvolvidas nos gráficos de adsorção, ou seja, da relação entre a concentração inicial e da adsorvida e levando-se em consideração o fator econômico na presença de inclinações semelhantes, a determinação das concentrações

ótimas de HS-PEG-NH₂ 3500 e HS-PEG-NH₂ 7500 para cada uma das soluções de nanopartículas foi possibilitada.

As concentrações ótimas, estimadas através dos fatores já mencionados, foram de 1,5 mg/mL, 5 mg/mL e 6 mg/mL de HS-PEG-NH₂ 3500 para as AuNPs de 20, 40 e 80 nm e de 1,2 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5 mg/mL de HS-PEG-NH₂ 7500 respectivamente.

A fim de comprovar a eficiência dos métodos (colorimétrico e cromatográfico) de quantificação de grupos sulfidrílicos, as concentrações adsorvidas de ambos os polímeros para cada uma das soluções coloidais de AuNPs quando modificadas com as concentrações descritas na Tabela 13, foi analisada por ambas as metodologias. Os resultados, juntamente com o desvio padrão entre os métodos, são apresentados na Tabelas 13.

Tabela 13. Concentrações adsorvidas de HS-PEG-NH₂ 3500 e HS-PEG-NH₂ 7500 pelas AuNPs estimadas por meio dos dois métodos de quantificação de grupos sulfidrílicos

Tamanho das AuNPs (nm)	HS-PEG-NH ₂ 3500			HS-PEG-NH ₂ 7500		
	Colorimétrico (mg/mL)	Cromatográfico (mg/mL)	Desvio (mg/mL)	Colorimétrico (mg/mL)	Cromatográfico (mg/mL)	Desvio (mg/mL)
20 nm	0,319	0,434	0,081	0,199	0,389	0,134
40 nm	1,620	1,911	0,206	0,911	0,944	0,023
80 nm	2,995	2,706	0,205	1,609	1,488	0,086

Uma ampla gama de concentrações de PEG tiolado visando a estabilização de soluções de AuNPs podem ser encontradas na literatura, podendo esta ser observada na faixa de microgramas (TAKAE *et al.*; 2005), miligramas (LING; JIANG; ZHANG, 2013; SIRIWARDANA *et al.*; 2014) ou ainda em gramas (CIAURRIZ *et al.*, 2017). Dentre os principais fatores relacionados à ampla faixa de concentrações observadas estão a massa molar, as terminações, o tamanho da cadeia polimérica e, conseqüentemente, a conformação das moléculas de PEG adsorvidas (LING; JIANG; ZHANG, 2013). Além disso, o diâmetro das nanopartículas e a concentração das soluções coloidais também são levados em conta.

Sendo assim, apesar de não haver um consenso sobre a concentração ideal de PEG tiolado para a estabilização de AuNPs com diferentes tamanhos, as concentrações ótimas no presente trabalho encontram-se dentro da faixa apresentada na literatura (LING; JIANG; ZHANG, 2013; SIRIWARDANA *et al.*; 2014).

5.3.2 Modelos matemáticos

Tendo em vista a determinação de uma relação entre o diâmetro das AuNPs, a concentração inicial de PEG empregada e a concentração adsorvida pelas nanopartículas para ambas as variedades de PEG tiolados, modelos matemáticos e equações foram desenvolvidos utilizando a ferramenta *Curve Fitting* do software Matlab. Os modelos e equações podem ser observados na Figura 37 A-C e nas Equações 5 e 6.

A escala de cores dos modelos, do azul ao vermelho, está relacionada com o aumento da concentração adsorvida de PEG pelas AuNPs. Conforme o aumento da adsorção, maior a tendência para o vermelho, quanto menor, para o azul. Apesar das maiores adsorções serem observadas nas regiões em vermelho estas se encontram nas maiores concentrações iniciais, dessa forma as razões obtidas entre as concentrações empregadas nestas são semelhantes ou inferior às observadas nas regiões em azul. Nessa, razões maiores são obtidas, uma vez que as concentrações iniciais também são pequenas.

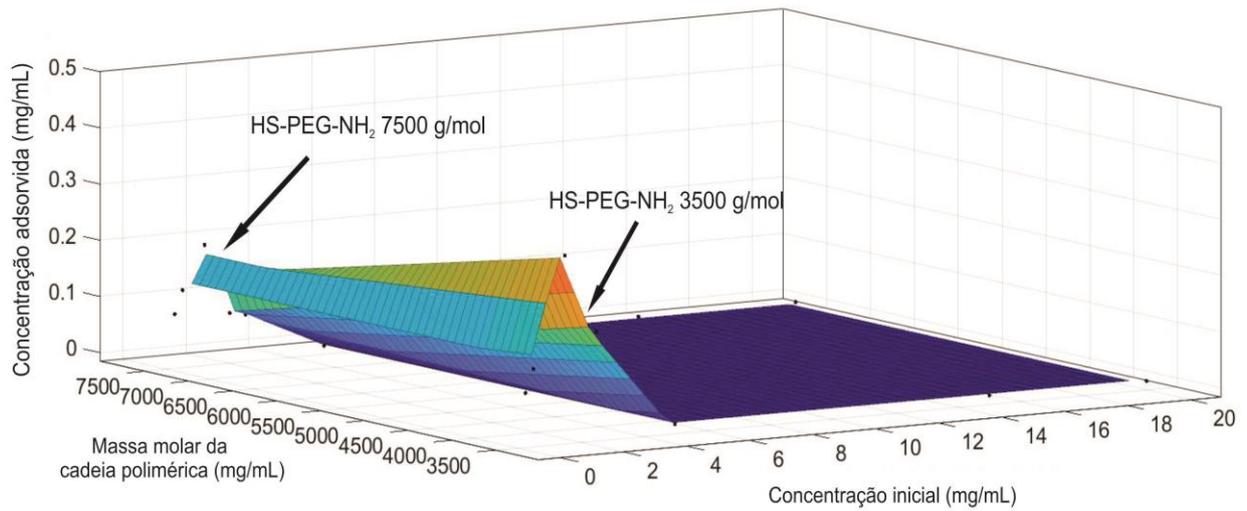
Além disso, foi possível observar a influência das concentrações iniciais sobre a concentração de PEG adsorvida pelas nanopartículas de 20, 40 e 80 nm. Para os três gráficos observou-se a estabilização da concentração adsorvida pelas nanopartículas com o aumento da concentração inicial e com o aumento da massa da cadeia polimérica. Segundo Jokerst *et al.*, (2011) e Rahme *et al.* (2013), tal evento pode estar relacionado com a relação entre a massa da cadeia polimérica e o número de ligantes proporcionado por ela, uma vez que quanto maior a cadeia, maior o impedimento estérico entre elas e conseqüentemente menor o número de ligantes. Sendo esse último, o responsável pela estabilização na adsorção.

Da mesma forma o aumento no número de ligantes e, conseqüentemente, a redução da massa da cadeia polimérica, possibilita que maiores concentrações sejam adsorvidas, (regiões em vermelho). Este fato foi acentuado para a solução de AuNPs de 20 nm, uma vez que a estabilização ocorre até a concentração previamente definida como ótima e em concentrações maiores o impedimento estérico, proporcionado pelo aumento das cadeias poliméricas, faz com que a adsorção de PEG seja dificultada.

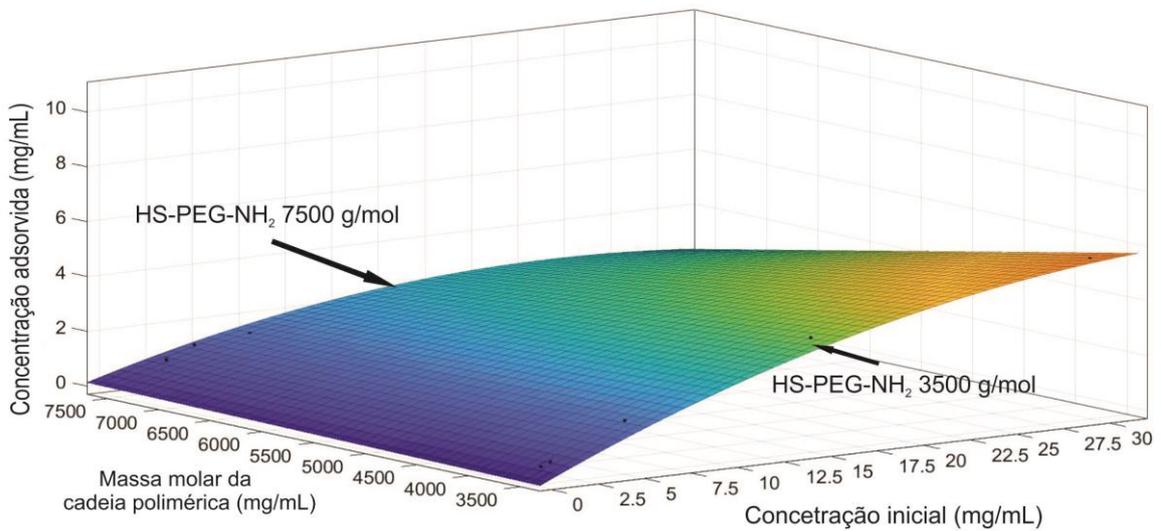
Através das equações propostas visa-se a obtenção de curvas que relacionem a concentração inicial, a massa da cadeia polimérica e a concentração adsorvida de diferentes variedades de PEG tiolados quando em contato com soluções de AuNPs de 40 e 80 nm (Equações 1 e 2). Já para a solução coloidal de AuNPs de 20 nm, embora o software apresente distintas formas de aproximação, nenhuma dessas gerou uma equação que se adequasse ao

comportamento de adsorção apresentado. Sendo assim, por causa disso e pelas concentrações adsorvidas de PEG que se aproximaram dos limites de detecção dos métodos de quantificação, nas etapas 4, 5 e 6 foram estabilizadas e empregadas na captura da enzima HRP apenas as soluções de AuNPs de 40 e 80 nm.

A



B



C

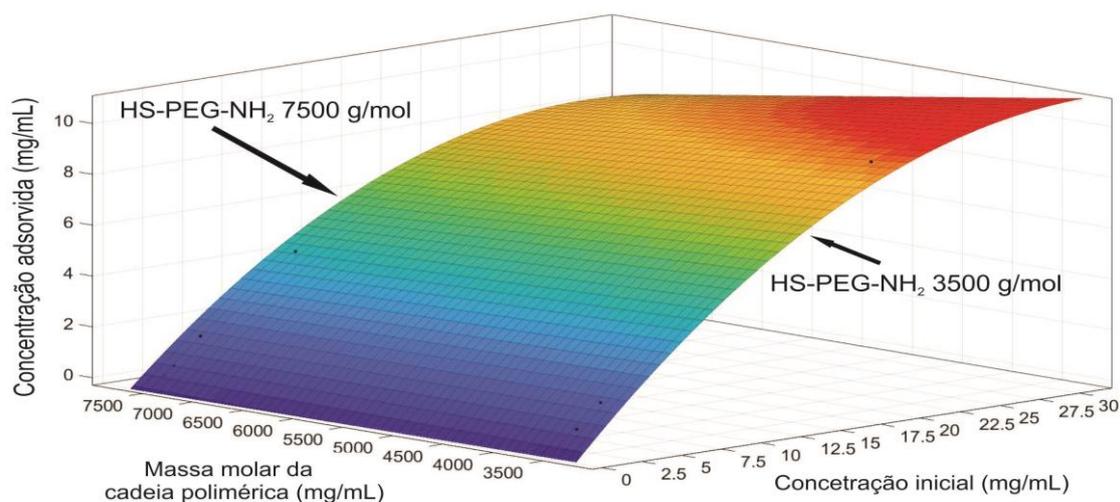


Figura 37. Modelo matemático para as nanopartículas de 20 nm. (A), 40 nm (B) e 80 nm (C).

$$\text{Concentração adsorvida (mg/mL)} = 0,001005 + 0,3927x + 3,334e^{-05}y - 0,004064x^2 - 2,557e^{-05}xy \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\text{Concentração adsorvida (mg/mL)} = -0,6171 + 0,7596x + 5,317e^{-05}y - 0,01047x^2 - 2,123e^{-05}xy \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

x: Concentração inicial (mg/mL);

y: Massa molecular da cadeia polimérica.

Através de ambas as relações desenvolvidas, espera-se que seja possível pré-determinar o comportamento das soluções coloidais de 40 e 80 nm quando em contato com diferentes variedades de PEG tiolados, sem a necessidade da realização de novos testes cinéticos.

5.3.3 Modificação das superfícies com as concentrações ótimas de polietilenoglicol heterobifuncional

Uma vez definidas as concentrações ótimas de ambos os polímeros, foram feitas imagens em MEV/FEG e MET, análises de potencial zeta e DLS das soluções de 20, 40 e 80 nm após a modificação. Foi avaliado o recobrimento da superfície das nanopartículas pelos filmes poliméricos e a dispersão dessas nos tempos de 12 e 24 h de contato com o meio

dispersante previamente definido.

As imagens em MEV-FEG podem ser observadas na Figuras 38 (A-D aumento de 100.000 vezes e E-L aumento de 50.000 vezes) e as imagens de MET na Figura 39 A-H. Os diâmetros médios de uma amostragem de 300 AuNPs estimados a partir da técnica de DLS e os potenciais zeta podem ser observados na Tabela 14 para o HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e na Tabela 15 para o HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol.

Tabela 14. Diâmetros médios e potenciais zeta medidos para as soluções coloidais de AuNPs estabilizadas com HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol

Tamanhos AuNPs	Diâmetro médio para 12 h de contato (nm)	Potencial zeta (mV)	Diâmetro médio para 24 h de contato (nm)	Potencial zeta (mV)
20 nm	93,64 ± 2,87	-6,70 ± 2,89	61,05 ± 1,43	-2,22 ± 0,67
40 nm	144,32 ± 2,17	-11,39 ± 4,53	85,36 ± 23,71	-5,95 ± 4,44
80 nm	80,94 ± 23,21	-8,85 ± 4,16	108,10 ± 28,50	-6,12 ± 2,28

Tabela 15. Diâmetros médios e potenciais zeta medidos para as soluções coloidais de AuNPs estabilizadas com HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol

Tamanho AuNPs (nm)	Diâmetro médio para 12 h de contato (nm)	Potencial zeta (mV)	Diâmetro médio para 24 h de contato (nm)	Potencial zeta (mV)
20	44,70 ± 21,76	-9,69 ± 5,04	57,74 ± 3,86	-2,00 ± 0,72
40	41,75 ± 10,30	-4,68 ± 1,98	67,60 ± 1,80	-5,77 ± 0,42
80	118,41 ± 1,63	-7,10 ± 2,78	100,07 ± 48,37	-3,07 ± 1,39

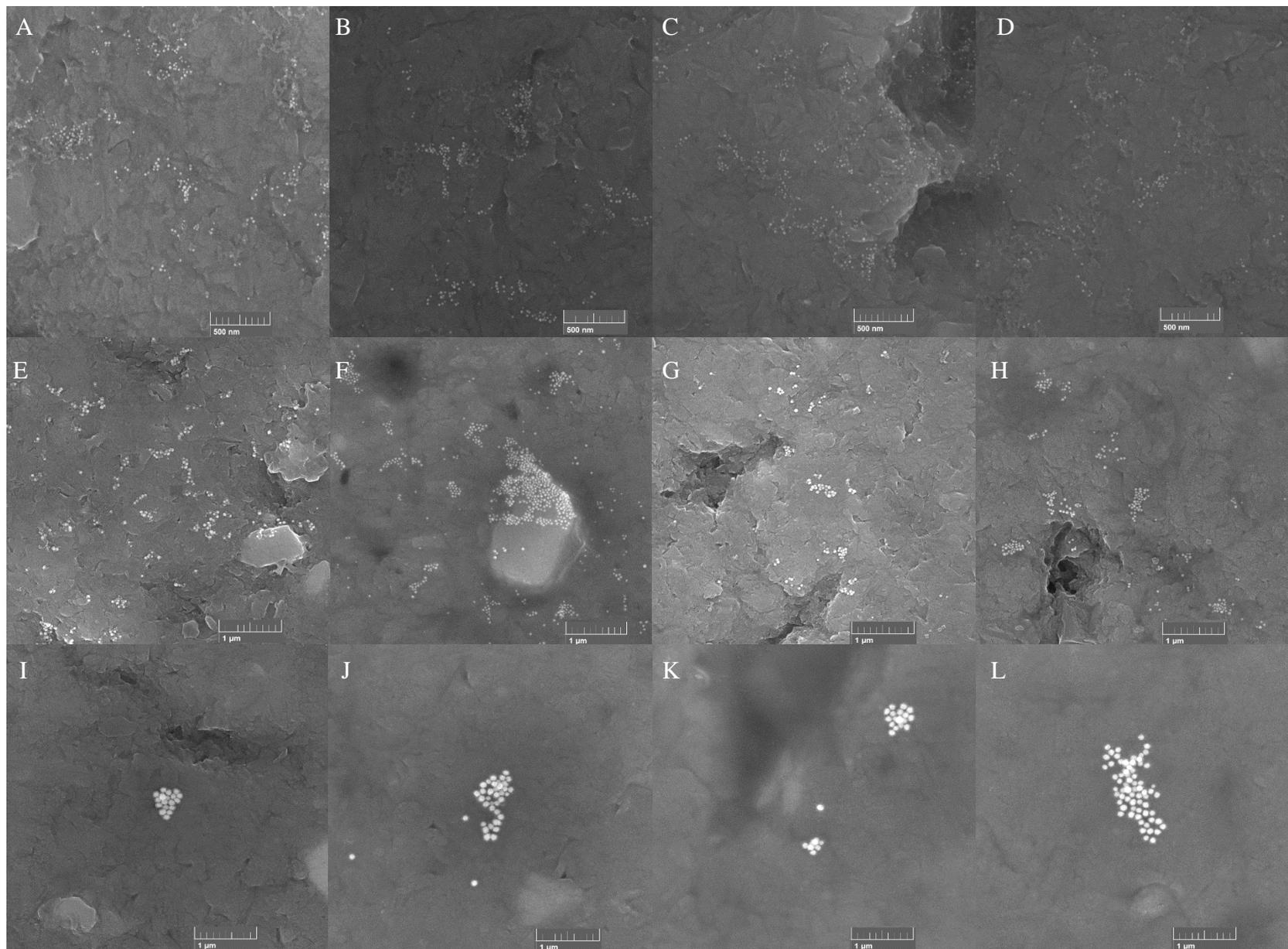


Figura 38. Imagens de MEV/FEG, (A) 20 nm com PEG 3500, t=12 h; (B) t=24 h; (C) 20 nm com PEG 7500, t=12 h (D) t=24 h; (E) 40 nm com PEG 3500, t=12 h; (F) t=24 h; (G) 40 nm com PEG 7500, t=12 h (H) t=24 h; (I) 80 nm com PEG 3500, t=12 h; (J) t=24 h; (K) 80 nm com PEG 7500, t=12 h (L) t=24 h

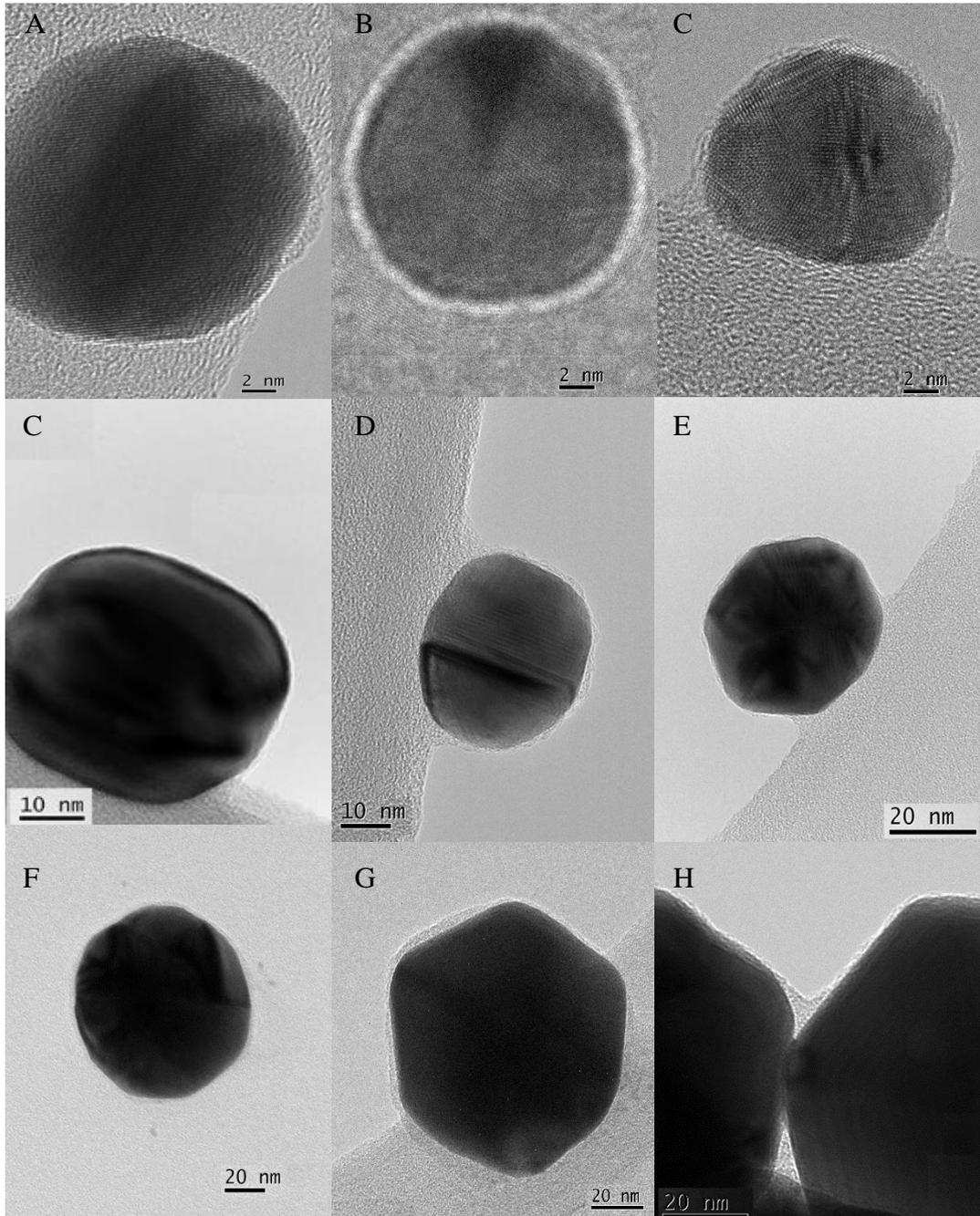


Figura 39. Imagens de MET, (A) Padrão 20 nm; (B) 20 nm com PEG 3500; (B) 20 nm com PEG 7500; (D) Padrão 40 nm; (E) 40 nm com PEG 3500; (F) 40 nm com PEG 7500; (F) Padrão 80 nm; (G) 80 nm com PEG 3500; (H) 80 nm com PEG 7500.

Ambas as variedades de PEG formam uma camada protetora única na superfície do nanopartículas, sendo esta possivelmente a responsável pela repulsão entre as partículas e pela redução na formação de aglomerados (LIU *et al.*, 2007; LING; JIANG; ZHANG, 2013). As espessuras dos filmes poliméricos sobre a superfície das nanopartículas de ouro estabilizadas foram medidas e essas foram comparadas com as soluções padrão, ou seja, as soluções que não passaram pela etapa de estabilização. Para as soluções de AuNPs padrão de 20, 40 e 80 nm as

medições destacaram filmes de $0,32 \pm 0,18$ nm, $0,33 \pm 0,09$ nm e $1,6 \pm 0,94$ nm, respectivamente. Esses filmes podem estar relacionados com a presença de moléculas de citrato de sódio, solução em que as AuNPs são comercializadas ou ainda pela troca destas moléculas por moléculas de água. Já para as soluções de AuNPs estabilizadas com as variedades de PEG tiolados, foi possível observar a formação de filmes mais espessos, sendo esses de $0,64 \pm 0,12$ nm, $1,71 \pm 0,75$ nm e $6,29 \pm 2,37$ nm para as AuNPs de 20, 40 e 80 nm modificadas com HS-PEG-NH₂ 3500 g/mol e de $0,72 \pm 0,28$ nm, $0,67 \pm 0,22$ nm e $3,34 \pm 1,39$ nm para as AuNPs de 20, 40 e 80 nm modificadas com HS-PEG-NH₂ 7500 g/mol. Entretanto, apesar da adsorção dos polímeros ter sido evidenciada, não foi possível observar a formação de uma camada mais espessa quando empregado o polietilenoglicol de maior cadeia, o PEG 7500, assim como apontado por Ling, Jiang, Zang (2013). Os autores avaliam a influência da massa molar de quatro variedades de PEG tiolados sobre a espessura do filme polimérico formado sobre a superfície de nanopartículas de ouro de 16 e 26 nm. Para as nanopartículas menores foram observados filmes com espessura em nanômetros de $3,398 \pm 0,298$ (PEG 1450), $6,017 \pm 0,368$ (PEG 4600), $8,086 \pm 0,279$ (PEG 8000) e $9,903 \pm 0,432$ (PEG 10000). Já para as maiores foram observados filmes de $3,444 \pm 0,411$ (PEG 1450), $6,096 \pm 0,349$ (PEG 4600), $7,974 \pm 0,397$ (PEG 8000) e $10,032 \pm 0,387$ (PEG 10000).

A partir das análises das imagens de MEV/FEG e dos diâmetros médios estimados pela técnica de DLS, foi possível observar que houve melhora na dispersão das partículas das três soluções coloidais, quando comparada aos valores obtidos nas etapas 1 e 2 (páginas 64 e 70), apesar de ainda ter sido observada a formação de aglomerados (Figura 38 I - L). Entretanto, diferentemente dos testes anteriores, o afastamento entre as partículas é evidenciado, comprovando a repulsão eletrostática entre elas ocasionada pela adsorção de ambos os polímeros.

Em relação aos valores de potencial zeta apresentados nas Tabelas 14 e 16, estes corroboram com a adsorção de ambos os polímeros sobre a superfície das nanopartículas. Uma vez que quando comparados aos valores das soluções padrão, apresentados na Tabela 12 (página 70), há um aumento acentuado para todas as condições avaliadas, indicando a interação entre os polímeros e as nanopartículas e, conseqüentemente, o recobrimento da superfície dos colóides.

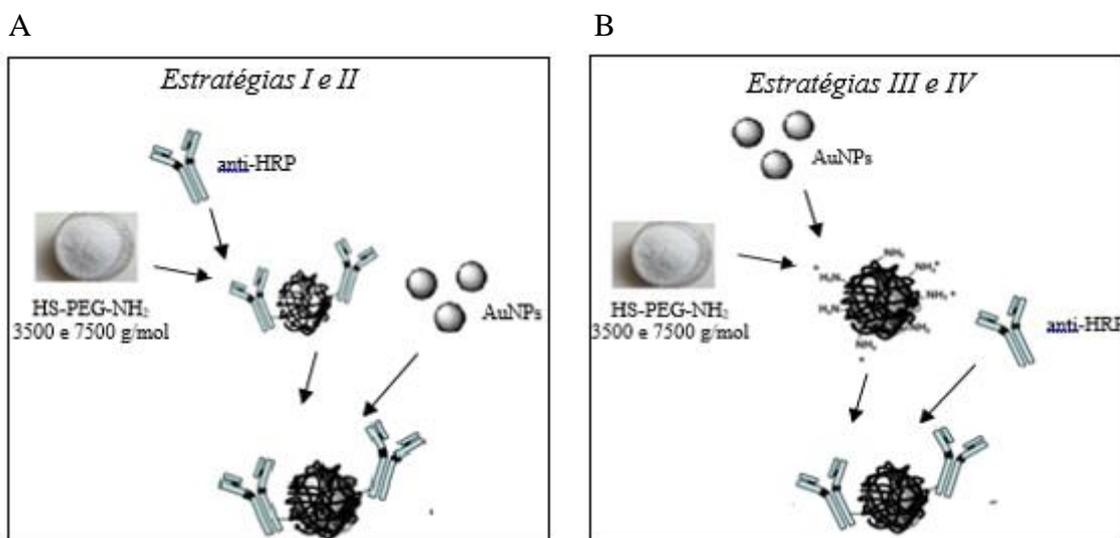
Wang *et al.* (2013) avaliaram a influência de três variedades de PEG tiolados (PEG 2000, PEG 5000 e PEG 20000) sobre o potencial zeta de nanopartículas de 30 nm inicialmente estabilizadas com citrato de sódio. De acordo com os autores, os potenciais zeta aumentaram

significativamente com o aumento da cadeia polimérica de PEG. Os potenciais aumentaram de cerca de -50,0 mV da condição inicial para -11,2, -3,8 e -2,7 mV quando empregados os PEG 2000, PEG 5000 E PEG 20000, respectivamente. Ainda segundo os autores, este fato está relacionado com a maior espessura da camada de PEG em torno das nanopartículas de ouro.

5.4 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE FUNCIONALIZAÇÃO

Após a funcionalização das nanopartículas, foi avaliada a captura da macromolécula HRP. Na etapa 4 foram empregadas as soluções coloidais de AuNPs de 40 e 80 nm, devido ao fato destas apresentarem resultados mais promissores tanto em relação da dispersão das partículas, como por ter sido possível estabelecer um modelo matemático para o comportamento de adsorção destas.

Uma representação esquemática das diferentes estratégias e os resultados obtidos, a partir da medição indireta de HRP presente nos sobrenadantes das amostras, pelo método enzimático baseado na oxidação do ABTS, nos dois tempos definidos, são apresentados nas Figuras 40 A e F para as nanopartículas de 40 e 80 nm.



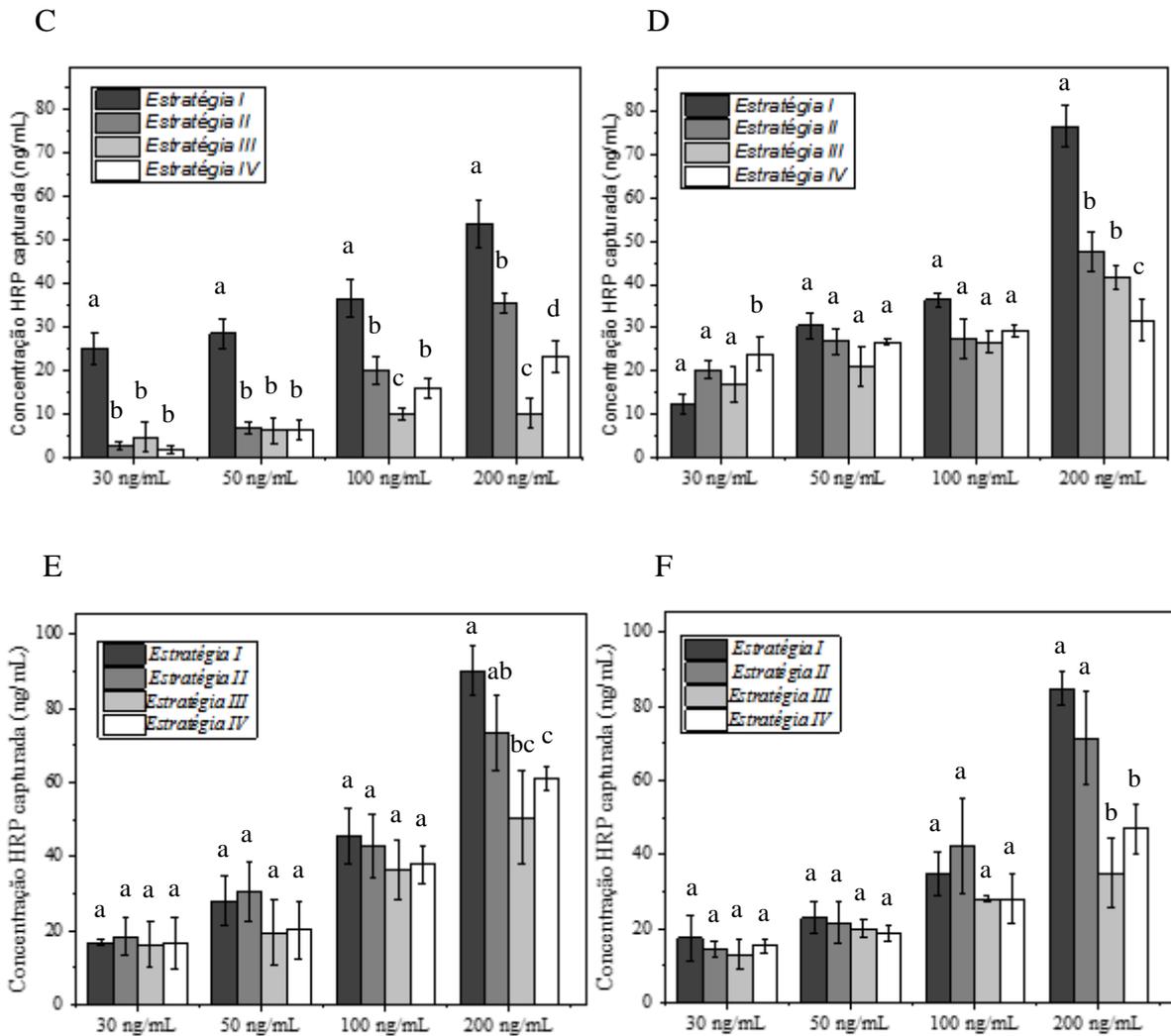


Figura 40. Representação esquemática das estratégias empregadas, (A) estratégias I e II e (B) estratégias III e IV. Concentrações de enzima capturada para cada uma das estratégias de funcionalização nos tempos de 2h (C) e 12h (D) para as nanopartículas de 40 nm e nos tempos de 2h (E) e 12h (F) para as nanopartículas de 80 nm.

Através da análise dos gráficos presentes na Figura 40, foi possível verificar que houve diferença significativa na captura proporcionada pelas estratégias I e II quando comparadas com as estratégias III e IV tanto com a solução coloidal de 40 nm quanto com a de 80 nm para as diferentes concentrações da enzima, especialmente para as concentrações de 100 e 200 ng/ de HRP. Sendo assim, a potencialidade de ambas estratégias para a captura de diferentes antígenos, a partir da troca dos anticorpos, foi evidenciada.

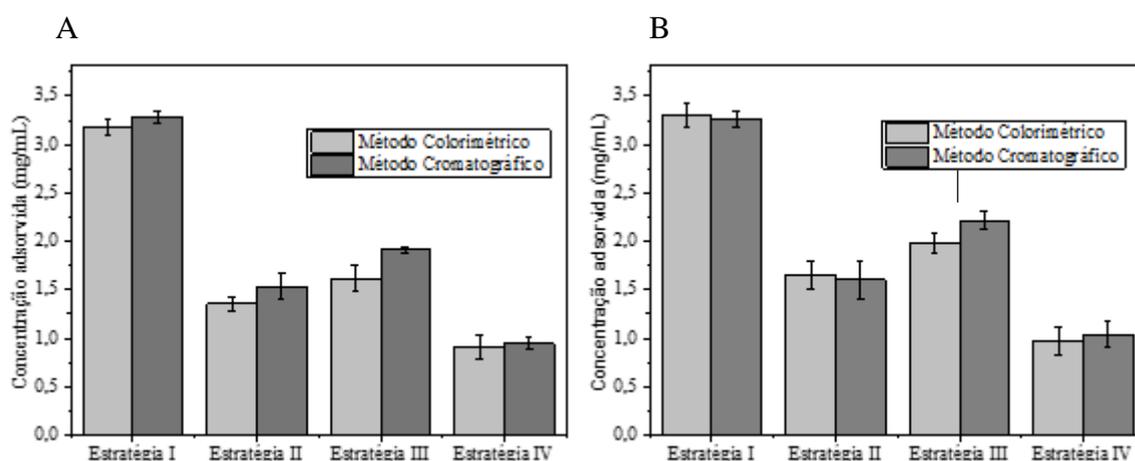
Em relação aos tempos avaliados, apesar da maior captura ter sido evidenciada na Figura 40 D, para a concentração de 200 ng/mL de HRP, o mesmo não foi observado com as nanopartículas de 80 nm. Para essas, o comportamento tanto para o tempo de 2 h quanto para 12 h foi semelhante, apesar dos desvios elevados de algumas condições. Dois fatores podem ter

contribuído para isso, sendo eles a diluição da solução de anticorpos anti-HRP estabelecida e a adsorção de polietilenoglicol pelas nanopartículas de 80 nm ter sido semelhante para ambos os tempos.

Assim como relatado por Puertas *et al.* (2011) e Sasha *et al.* (2017), a relação entre as concentrações de enzima e de seu respectivo anticorpo são de caráter imprescindível para a eficácia da estratégia de funcionalização empregada. Uma vez que quando não há regiões Fab suficientemente expostas, a captura e, conseqüentemente, a eficiência da estratégia é prejudicada. Assim como foi relatado para a situação oposta, quando há muitas regiões Fab expostas durante a imobilização, o reconhecimento do antígeno é dificultado.

Dessa forma, o comportamento de captura observado para soluções de 80 nm perante as diferentes estratégias, pode estar relacionado com a elevada diluição da solução de anticorpos anti-HRP empregada (1:500). Esta aparenta ter sido o fator limitante neste ensaio, uma vez que as concentrações capturadas não foram influenciadas pelo tempo de contato entre as soluções funcionalizadas e o antígeno apesar das variadas estratégias, diferentemente do observado para as soluções de 40 nm.

Em relação a adsorção de polietilenoglicol heterobifuncional, estas foram avaliadas para os dois tempos definidos, tanto para as soluções de 40 nm quanto de 80 nm. Inicialmente foi utilizado o método colorimétrico e na sequência, a fim comprovar os dados observados, com o método cromatográfico. A comparação entre as concentrações adsorvidas pode ser observada nas Figuras 41 A-D.



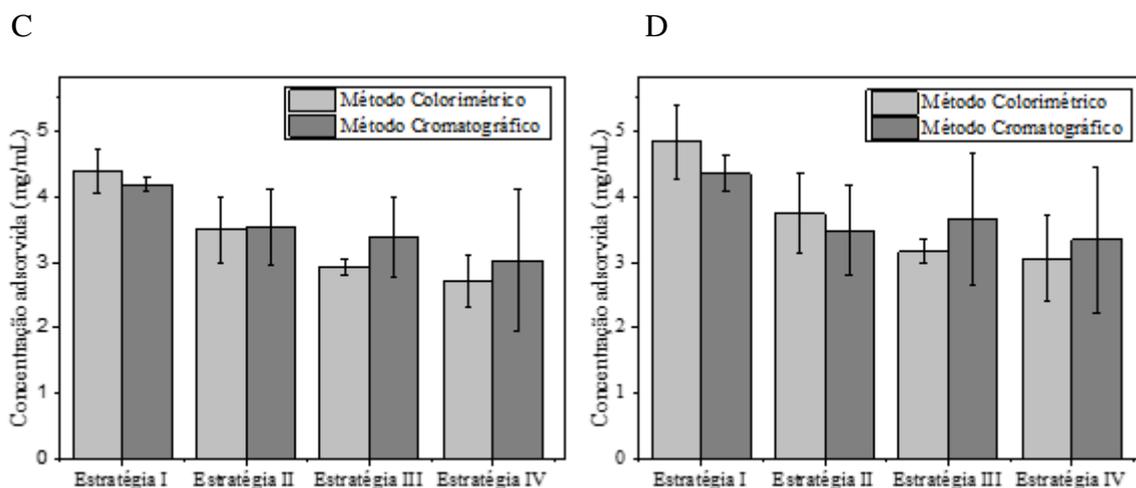


Figura 41. Concentrações de polietilenoglicol heterobifuncional adsorvida para cada uma das estratégias nos tempos de 2 h (A); 12 h (B) para nanopartículas de 40 nm e nos tempos de 2 h (C); 12 h (D) para as nanopartículas de 80 nm.

Assim como foi observado para a captura da enzima HRP, a adsorção de ambos os polímeros proporcionada pela metodologia das estratégias I e II, foi superior as demais para a solução coloidal de 40 nm. O mesmo foi observado para a solução de 80 nm, apesar das diferenças entre as concentrações adsorvidas pelas estratégias I e II em relação às adsorvidas pelas estratégias III e IV não terem sido tão significativas quanto o observado nas Figuras 41 A e B.

Estes fatos corroboram com a influência da adsorção de polietilenoglicol sobre a eficácia das estratégias, visto que para a solução de 40 nm, a qual apresentou a maior diferenciação entre as quatro estratégias para a captura da enzima, também apresentou maiores concentrações adsorvidas dos polímeros, tanto para a estratégia I quanto para a II (Figuras 40 C e D e Figuras 41 A e B).

Sendo assim, amostras preparadas empregando as estratégias I e II foram submetidas a análises de DLS e potencial zeta, a fim de avaliar os diâmetros médios das AuNPs e confirmar a adsorção do PEG e dos anticorpos sobre a superfície das nanopartículas. Para isso, o tempo de estabilização foi fixado em 2 h, visto que os resultados obtidos para o tempo de 12 h, apesar de superiores, não justificariam o tempo de ensaio prolongado. Após a estabilização, as soluções resultantes foram mantidas em água ultrapura durante 12 h. Os dados obtidos, para uma amostragem de 300 AuNPs, podem ser observados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Diâmetros médios para as soluções coloidais de AuNPs obtidos na etapa 4

Tamanho AuNPs	Diâmetro médio para 12 h de contato com água ultrapura		
	Solução padrão (nm)	Estratégia I (nm)	Estratégia II (nm)
40 nm	149,93 ± 31,91	88,98 ± 6,86	90,44 ± 4,92
80 nm	124,02 ± 32,78	95,58 ± 11,81	81,81 ± 12,22

Tabela 17. Potencial zeta das soluções coloidais de AuNPs obtidas na etapa 4

Tamanho AuNPs	Potencial zeta para 12 h de contato com água ultrapura		
	Solução padrão (mV)	Estratégia I (mV)	Estratégia II (mV)
40 nm	-13,43 ± 3,63	-7,74 ± 5,25	-5,50 ± 3,33
80 nm	-17,84 ± 4,22	-11,60 ± 1,79	-13,78 ± 1,01

Por meio das análises de DLS, foi possível comprovar a eficiência de ambas as estratégias quanto à dispersão das partículas. Uma vez que a redução dos diâmetros médios foi evidente, quando comparados aos medidos para as soluções padrão. Já na Tabela 17, a qual representa a medida do potencial zeta dos sistemas anticorpo/PEG/nanopartículas, ocorreu o aumento dos valores, indicando que houve a ligação anticorpo e PEG e, por último, com as nanopartículas.

Ainda foi possível observar que os valores medidos para a solução coloidal de 40 nm foram semelhantes aos observados na etapa 3, indicando que a modificação das superfícies não foi dificultada pela inserção dos anticorpos ao sistema. Entretanto, o mesmo tipo de comportamento não foi observado para a solução de 80 nm. Nesta apesar do aumento do potencial zeta, os valores foram inferiores aos observados na etapa 3 (página 77), indicando que os anticorpos não favoreceram a modificação das superfícies.

Visto que tanto a dispersão quanto a modificação das superfícies foram semelhantes para a solução de 40 nm, imagens em MEV/FEG foram avaliadas para ambas as condições (Figuras 42 A-F).

Já para a solução coloidal de 80 nm, apenas a solução modificada a partir da estratégia II foi selecionada. Isso devido ao fato desta estratégia ter apresentado melhores resultados quanto a dispersão das partículas e potencial zeta semelhante ao obtido pelas amostras modificadas com a estratégia I.

A fim de comparar a solução de 80 nm funcionalizada em laboratório com uma solução de nanopartículas de ouro comercializada, após a etapa de funcionalização, imagens de MEV/FEG destas e de um padrão adquirido da empresa Nanopartz com partículas de 75 nm foram feitas. O padrão foi diluído para que as concentrações de ambas as soluções fosse a

mesma. As imagens são apresentadas na Figura 43 A-F.

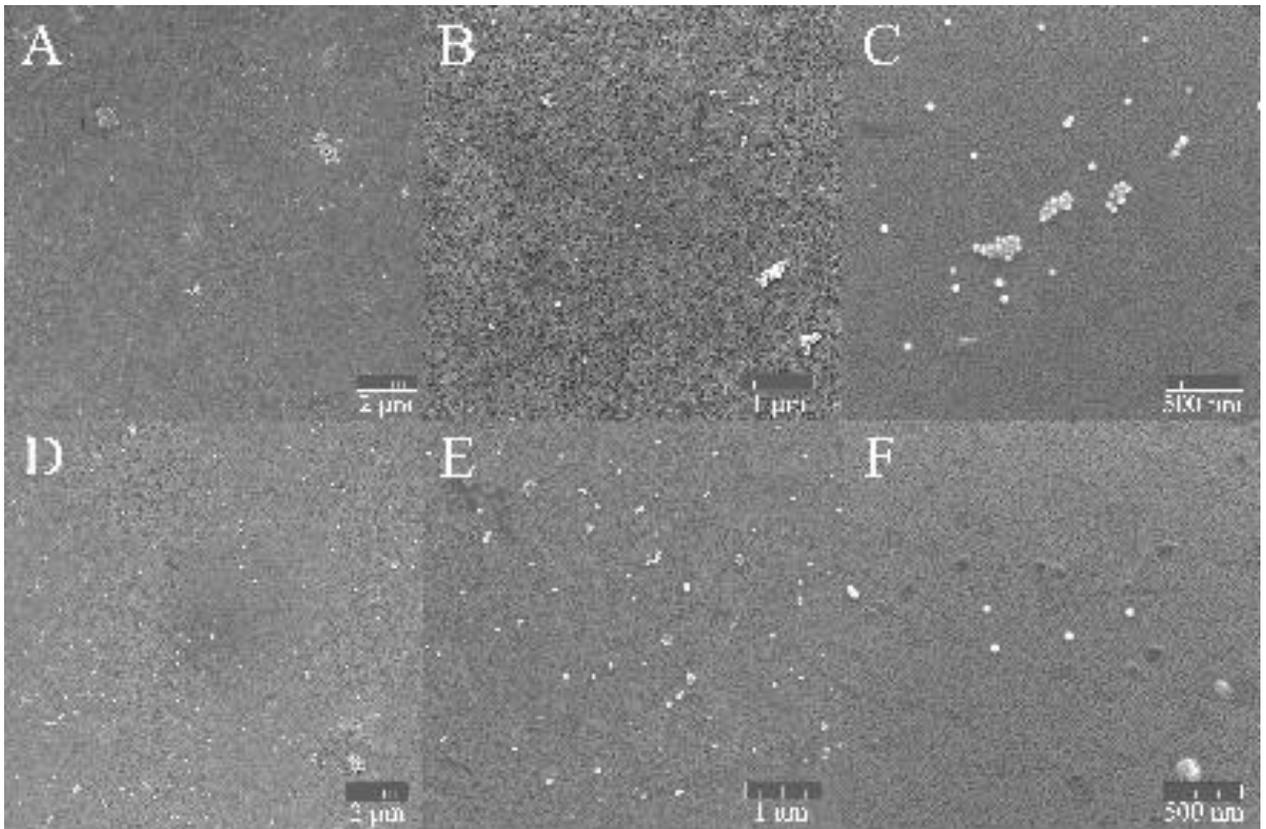


Figura 42. Solução de nanopartículas de ouro de 40 nm após a modificação com a estratégia I nos aumentos de 20000 vezes (A), 50000 vezes (B) e 100000 vezes (C) e modificadas com a estratégia II nos aumentos de 20000 vezes (D), 50000 vezes (E) e 100000 vezes (F).

A análise da Figura 42 corrobora com a melhora na dispersão das partículas, apontada pela técnica de DLS, de ambas as condições. Nestas imagens apesar de terem sido observados pequenos aglomerados, a dimensão destes é inferior às monocamadas formadas nos testes anteriores. Dessa forma, é possível afirmar que além dos anticorpos agregarem especificidade ao sistema, esses contribuíram para a modificação e conseqüentemente, para a repulsão entre as partículas.

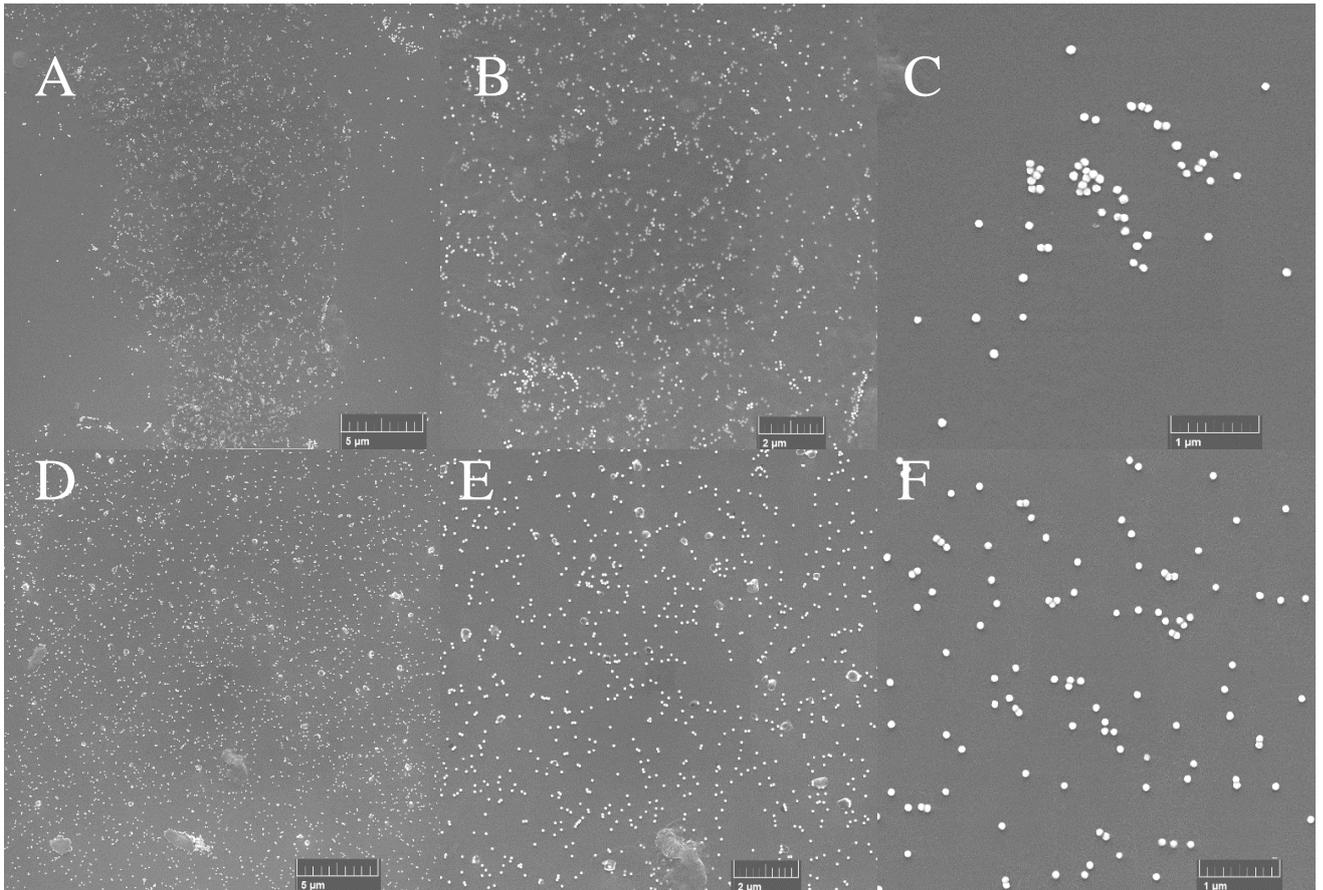


Figura 43. Solução de nanopartículas de 80 nm após a modificação com a estratégia II nos aumentos de 10000 vezes (A), 20000 vezes (B) e 50000 vezes (C). Padrão funcionalizado (75 nm) Nanopartz nos aumentos de 10000 vezes (D), 20000 vezes (E) e 50000 vezes (F).

Através da análise das imagens de MEV/FEG apresentadas na Figura 43, pode-se observar a semelhança entre a dispersão da amostra modificada em laboratório e o padrão comercializado pela empresa Nanopartz, principalmente nas imagens com os aumentos de 10000 (43 A e 43 D) e 20000 vezes (43 B e 43 E). Já nas imagens com o aumento de 50000 vezes foram observados aglomerados pequenos, mas com uma maior quantidade de partículas na solução modificada em laboratório do que no padrão comercializado, indicando que ainda é necessário melhorar a técnica empregada na estratégia II.

5.4.1 Avaliação da eficiência de captura das diferentes estratégias de funcionalização

Com a melhora na dispersão das partículas já confirmada para as estratégias I e II, na etapa 5 visou-se avaliar outro parâmetro, a eficiência de captura da enzima HRP pelas quatro

estratégias de funcionalização frente o tempo de armazenagem das soluções modificadas. Para isso, as amostras funcionalizadas durante 2 h foram submetidas a novos testes de captura em diferentes meses e os resultados obtidos foram comparados com os testes anteriores. Os comportamentos de adsorção das estratégias I a IV para as soluções coloidais de 40 e 80 nm podem ser observados na Figura 44 A-D na Figura 45 A-D.

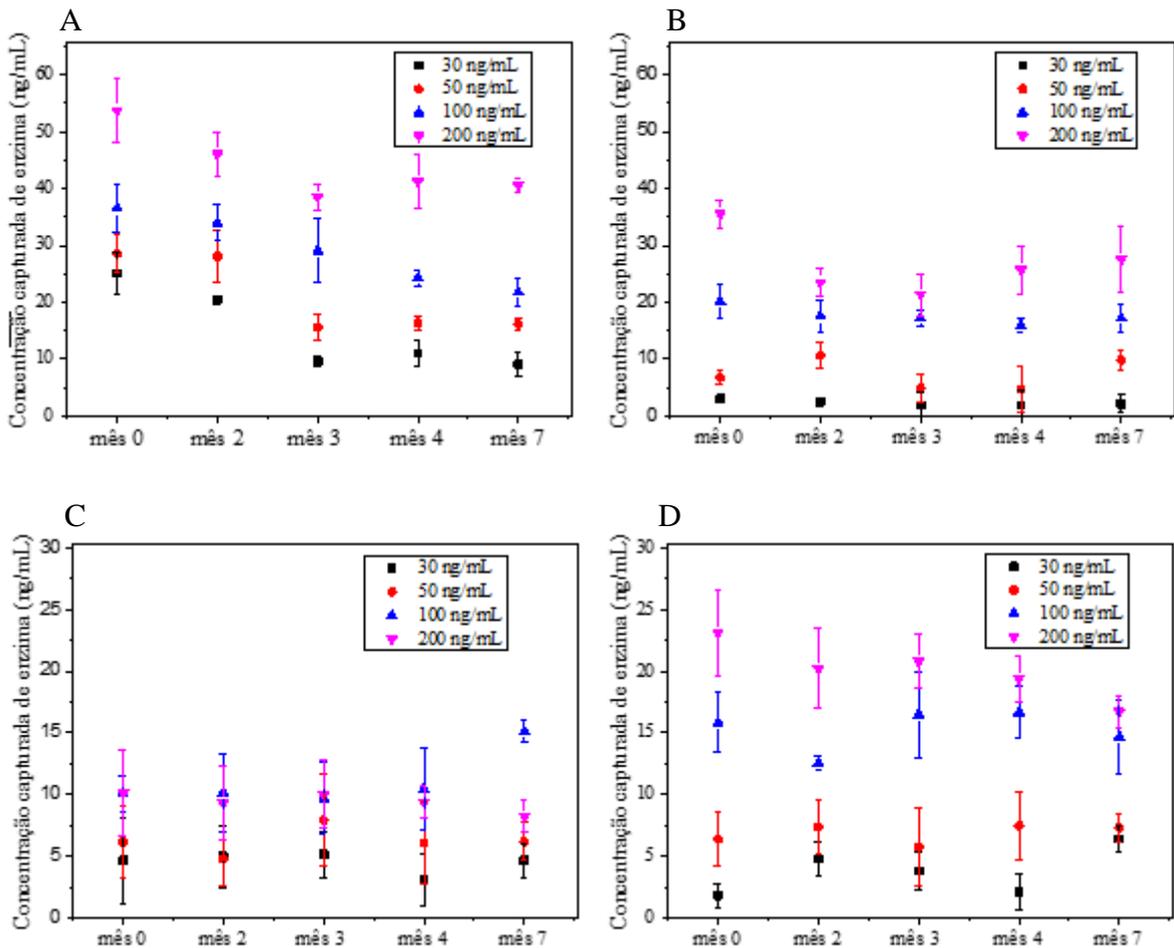


Figura 44. Concentrações da enzima horseradish peroxidase adsorvidas pelas quatro estratégias de funcionalização em diferentes meses para as nanopartículas de 40 nm. Estratégia I (A), estratégia II (B), estratégia III (C) e estratégia IV (D).

O decaimento na habilidade de captura da enzima com o decorrer dos meses para as soluções coloidais de 40 nm foi mais evidenciado nas estratégias que capturaram maiores concentrações no mês inicial, ou seja, nas estratégias I e II. Para a primeira, ao empregar a concentração de 200 ng/mL de enzima, por exemplo, a captura da enzima sofreu redução de 24% após 7 meses. Na segunda estratégia, a redução foi de 22%, enquanto que para a terceira e para a quarta estratégias, o decimento na habilidade de captura foi de concentração de enzima

capturada passou de 18,5% e 27,8% durante o mesmo período.

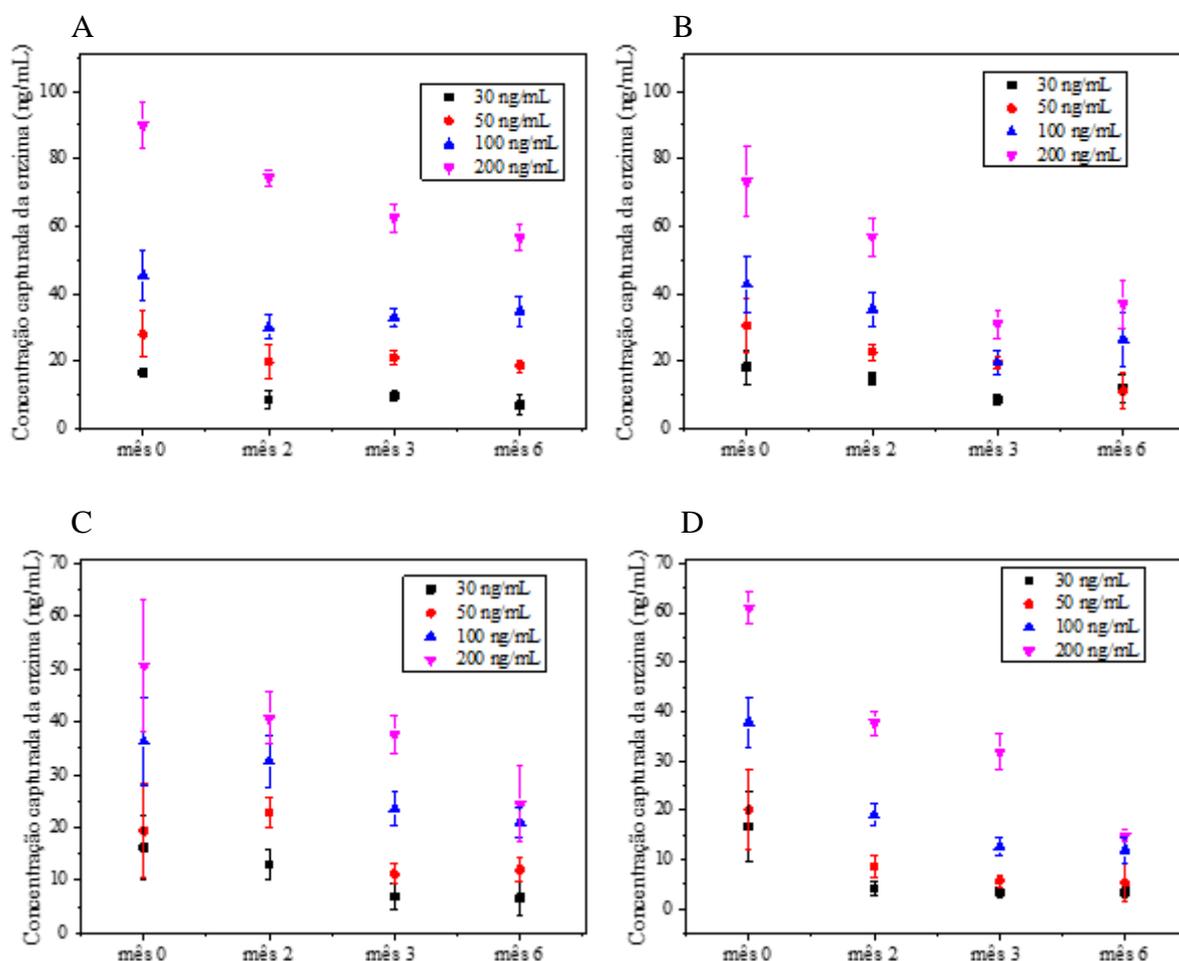


Figura 45. Concentrações da enzima horseradish peroxidase adsorvidas pelas a quatro estratégias de funcionalização em diferentes meses para as nanopartículas de 80 nm. Estratégia I (A), estratégia II (B), estratégia III (C) e estratégia IV (D).

Assim como observado para as AuNPs de 40 nm, o decaimento na habilidade de captura da enzima HRP foi observado para as AuNPs de 80 nm perante as quatro estratégias, entretanto para essas o decaimento foi mais acentuado, especialmente para a estratégia IV. Para essa ao empregar a concentração de 200 ng/mL de enzima, a captura da enzima sofreu redução de 75,9% após 6 meses. Para as demais estratégias os decaimentos na habilidade de captura foram de 37% (estratégia I), 49,9% (estratégia II) e 51,7% (estratégia III) durante o mesmo período.

Apesar da redução na capacidade de captura da enzima, quando levados em consideração fatores como a dispersão das partículas, a concentração de HRP capturada e a estabilidade durante diferentes meses, essenciais para que as estratégias possam vir a ser

implementadas em testes de diagnóstico, a estratégia que se mostrou mais promissora foi a estratégia II para a solução contendo nanopartículas de 40 nm.

5.4.2 Aplicações de estratégias de funcionalização em teste de diagnóstico virais

Na sexta etapa, buscou-se comparar os resultados obtidos com testes comerciais utilizando ou não nanopartículas de 40 nm funcionalizadas com a estratégia II deste estudo. A partir do uso desta estratégia visou-se a melhora na sensibilidade do dispositivo já comercializado quando as nanopartículas funcionalizadas fossem adicionadas ao sistema de diagnóstico. As respostas qualitativas obtidas pelos kits utilizados na ausência e na presença das nanopartículas funcionalizadas, em relação ao aumento da diluição do antígeno de interesse, podem ser observadas nas Figuras 46 A-C.

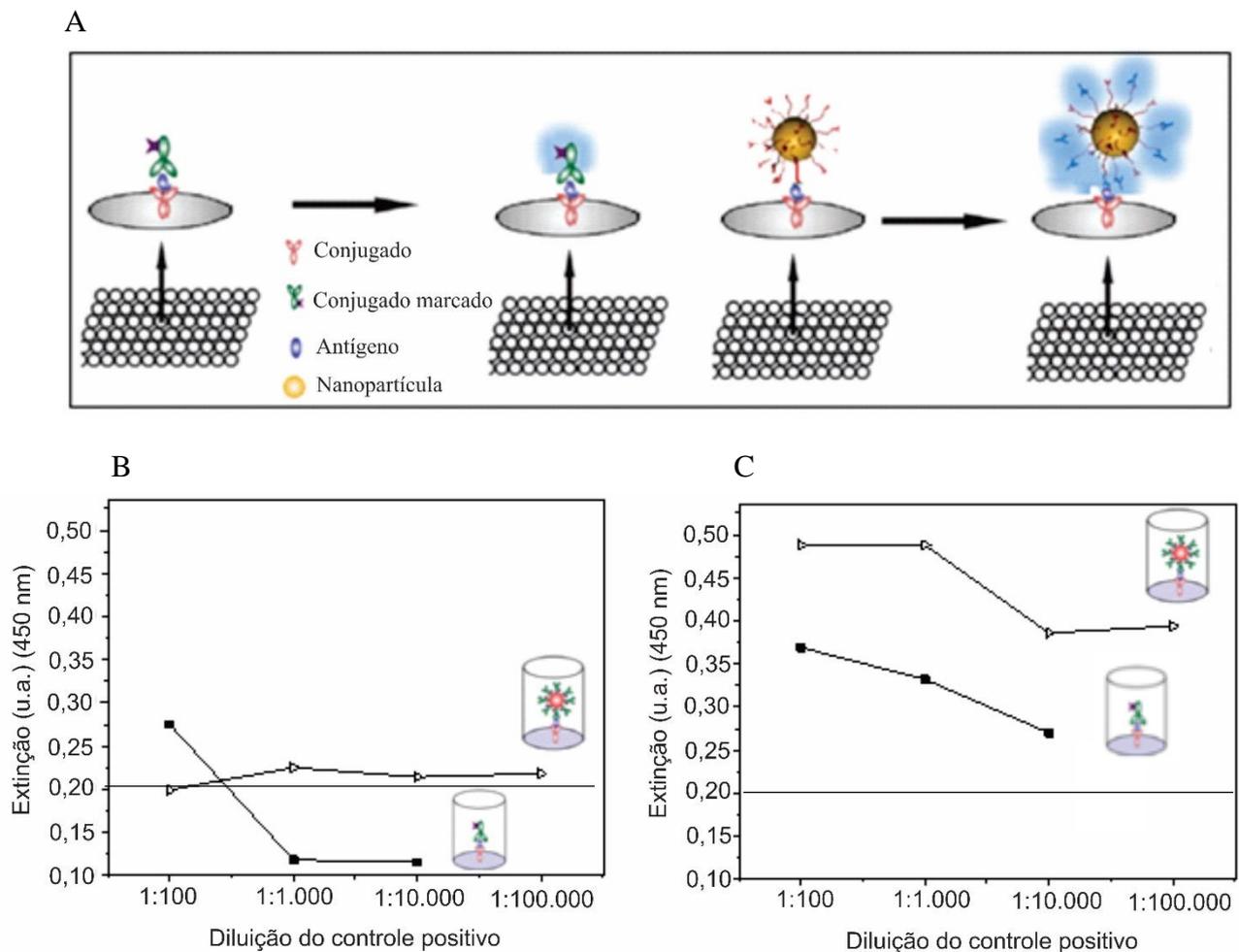


Figura 46. Representação da amplificação proporcionada pelas nanopartículas em testes ELISA (A) e resultados comparativos entre os testes controle (padrão do kit, sem nanopartículas) e com nanopartículas de 40 nm frente a estratégia II para detecção de (B) HCV e (C) HIV.

Segundo o fabricante dos kits BIOCLIN, respostas positivas são consideradas para absorvâncias superiores a 0,200. Dentro da faixa controle do kit de hepatite C, diluição do antígeno igual ou superior a 1:1.000 não foram detectados. Já quando empregada a solução coloidal de nanopartículas de 40 nm, a potencialidade desta estratégia pode ser destacada, uma vez que com a presença das nanopartículas funcionalizadas foi capaz de detectar o antígeno em diluições 1000 vezes inferiores a última resposta positiva apresentada pelo kit na ausência das nanopartículas.

Já para o kit de detecção de HIV, apesar de respostas positivas terem sido observadas tanto na ausência quanto na presença das nanopartículas, quando estas foram adicionadas ao sistema, a intensidade das absorvâncias medidas foi de até 50% superior as absorvâncias observadas para o teste ELISA comercializado nas diferentes diluições do controle positivo fornecido pelo kit.

Dessa forma, assim como destacado por Shawky, Bald e Azzazy (2010), Zhan *et al.* (2014), Kim *et al.* (2017) Lakshmiprya *et al.* (2016), as nanopartículas se mostram como uma grande promessa de atender às rigorosas demandas do laboratório clínico quanto à sensibilidade e custo-efetividade, e podem ser usadas no futuro em termos de diagnóstico de cuidados, possibilitando diagnósticos precoces e reduzindo, conseqüentemente, o número de contágios e o número de mortes propiciados por doenças como a hepatite C e a AIDS.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a importância do estudo e desenvolvimento de novas estratégias de estabilização e funcionalização de nanopartículas de ouro, uma vez que estas podem aferir propriedades que influenciam diretamente na dispersão e estabilidade destas. Além disso, através da utilização das novas estratégias, o incremento na sensibilidade de sistemas de diagnóstico virais foi possibilitado. Esta aplicação poderia vir a contribuir para o aumento de diagnósticos precoces de doenças como AIDS e Hepatite C e, conseqüentemente para a redução de mortes ocasionadas por ambas doenças.

Nas etapas 1 e 2, as quais visaram avaliar a estabilidade das soluções de AuNPs estabilizadas com PEG amino terminal 5000 g/mol, foi possível determinar que as concentrações definidas não foram capazes de modificar a superfície das nanopartículas. Embora tenha sido observada a redução dos aglomerados em algumas das condições testadas, a melhora na dispersão das partículas não foi evidenciada. Apesar disso, quando estas foram mantidas em variados meios dispersantes durante os tempos de 0; 2,5; 5,5; 8,5; 12; 24 e 48 h foi possível determinar que o meio no qual as soluções coloidais se mantiveram estáveis durante maior tempo foi o meio composto por água ultrapura.

Na etapa 3, inicialmente foi realizada a padronização de métodos de quantificação de sulfidrilas em solução e, através deles, as cinéticas das concentrações adsorvidas de dos polímeros heterobifuncionais (HS-PEG-NH₂ 3500 e 7500), os modelos matemáticos e as equações que relacionaram a concentração inicial de PEG tiolado, as concentrações adsorvidas pelas AuNPs e as massas das cadeias poliméricas de polietilenoglicol heterobifuncional puderam ser elaborados. Além disso nesta etapa, através das cinéticas, as concentrações ótimas para cada um dos tamanhos de nanopartículas foram determinadas, sendo estas de 1,5; 5 e 6 mg/mL com o HS-PEG-NH₂ 3500 e 1,2; 2,5 e 5 mg/mL com o HS-PEG-NH₂ 7500 para as soluções de 20, 40 e 80 nm, respectivamente.

A partir das técnicas de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta, foi possível observar a melhora na dispersão das partículas quando estas foram estabilizadas com as concentrações ótimas de HS-PEG-NH₂ 3500 e 7500, apesar da tendência a formação de monocamadas, especialmente pelas AuNPs de 80 nm ainda ter sido observada. Contudo, a repulsão eletrostática entre as partículas pôde ser demonstrada, comprovando a adsorção de ambos os polímeros sobre a superfície das nanopartículas.

Já na etapa 4, quando as soluções coloidais foram funcionalizadas por meio de quatro estratégias, a potencialidade das estratégias I e II, ou seja, nas que as soluções poliméricas foram postas em contato primeiramente com a solução de anticorpos anti-HRP, seguida pela adição das soluções coloidais de nanopartículas, foi verificada, uma vez que as concentrações de enzima capturada foi próxima ou superior às apresentadas pelas estratégias destacadas na literatura (estratégias III e IV) tanto para as nanopartículas de 40 nm quanto para as de 80 nm de diâmetro.

Na etapa 5, a eficiência de captura da enzima HRP pelas estratégias durante diferentes meses foi avaliada. Para isso, estas foram submetidas a novos testes durante 2, 3, 4 e 7 meses para a solução de 40 nm e durante 2, 3 e 6 meses para a solução de 80 nm, a fim de verificar as concentrações de enzima capturada com o decorrer dos meses. Ao empregar a concentração de 200 ng/mL de enzima, o decaimento da habilidade de captura foi observado para as quatro estratégias independentemente do tamanho da nanopartícula empregada. Para as soluções de AuNPs de 40 nm, os decaimentos foram de 24% para a estratégia I, de 22% para a estratégia II, de 18,5% para a estratégia III e de 27,8% para a estratégia 4 após 7 meses. Já para as soluções de 80 nm os decaimentos foram mais acentuados, sendo de 37% para a estratégia I, de 49,9% para a estratégia II, de 51,7% para a estratégia III e de 75,9% para a estratégia 4 após 6 meses.

Ainda foi observado na etapa 5 que apesar da redução na eficiência de captura da enzima, a estratégia que se mostrou mais promissora quando levados em consideração os fatores dispersão das nanopartículas, captura da HRP e estabilidade durante os diferentes meses de ensaio, foi a estratégia II para as nanopartículas de 40 nm.

Sendo assim, na etapa 6, estas foram utilizadas em testes comerciais baseados na detecção qualitativa de anticorpos para o vírus da hepatite C e AIDS (Bioclin Biolisa HCV e HIV), a fim de aferir se haveria melhora na sensibilidade do dispositivo comercializado. Quando empregada a solução coloidal de nanopartículas de 40 nm para o kit de hepatite C, a detecção do antígeno foi possibilitada em diluições 1000 vezes inferiores à última resposta positiva apresentada pelo kit na ausência das nanopartículas, enquanto que para o kit de detecção de HIV, a intensidade das absorvâncias medidas na presença das nanopartículas foi de até 50% superior as observadas para o teste ELISA, comprovando que a implementação das nanopartículas de ouro funcionalizadas, através da estratégia desenvolvida na presente dissertação, é uma excelente alternativa para agregar sensibilidade em testes de diagnóstico viral, como o ELISA.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**, 8.ed. Elsevier Saunders, 2015, 552p.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL - ABDI. **Estudo prospectivo de nanotecnologia**. Brasília, 2010.

ALENCAR, M. S. M.; BOCHNER, R.; DIAS, M. F. F. Nanotecnologia em ciências da saúde no brasil: um olhar informétrico sobre os grupos de pesquisa. **Liinc em revista**, v. 9, n. 1, p. 47-65, 2013.

ALCANTAR, N. A.; AYDIL, E. S.; ISRAELACHVILI, J. N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. **Journal Of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 3, p.343-351, 2000.

ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; SINGH, R. P.; PANDEY, M. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Application of octadecanethiol self-assembled monolayer to cholesterol biosensor based on surface plasmon resonance technique. **Talanta**, v. 69, n. 4, p.918 926, 2006.

BELL, N. C.; MINELLI, C.; SHARD, A. G. Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement. **Analytical Methods**, v. 5, n. 18, p.4591-4601, 2013.

BELTRAMI, M. Desenvolvimento e construção de sensor magnetoelástico de pH com eletrônica portátil. 2016.125f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias) Universidade de Caxias do Sul, 2016.

BEYER, N. H.; HANSEN, M. Z.; SCHOU, C.; HEEGAARD, N. H. H. Optimization of antibody immobilization for on-line or off-line immunoaffinity chromatography. **Journal Of Separation Science**, v. 32, n. 10, p.1592-1604, 2009.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, Nanotechnology in medicine. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, **Elsevier**, 2011.

BRONDANI, D.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I., C. Development of biosensor based on ionic liquid and corn peroxidase immobilized on chemically crosslinked chitin. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 138, n. 1, p.236-243, 2009.

BURTT, C. M.; SENANAYAKE, G. Effect of reductants and stabilizers on ageing of gold nanoparticles at pH 2–12 and application of nano-gold to study non-cyanide leaching in sodium hypochlorite/chloride solutions using UV–Visible spectroscopy. **Hydrometallurgy**, v. 164, p.166-176, 2016.

CANCINO, J. C. Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas de alcanotióis: uma abordagem sobre a transferência eletrônica. 2008. 125f. Dissertação (Mestre em Ciências/Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CARNOVALE, C.; BRYANT, G.; SHUKLA, R.; BANSAL, V. Size, shape and surface chemistry of nano-gold dictate its cellular interactions, uptake and toxicity. **Progress In Materials Science**, v. 83, p.152-190, 2016.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of Serum Albumin. **Lipoproteins, Apolipoproteins, And Lipases**, p.153-203, 1994.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 446 p.1996.

CHAUHAN, R.; SINGH, J.; SOLANKI, P. R.; MANAKA, T.; IWAMOTO, M.; BASU, T.; MALHOTRA, B. D. Label-free piezoelectric immunosensor decorated with gold nanoparticles: Kinetic analysis and biosensing application. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 222, p.804-814, 2016.

CIAURRIZ, P.; FERNÁNDEZ, F.; TELLECHEA, E.; MORAN, J. F.; ASENSIO, A. C. Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Beilstein Journal Of Nanotechnology**, v. 8, p.244-253, 2017.

CORDEIRO, M.; CARLOS, F. F.; PEDROSA, P.; LOPEZ, A.; BAPTISTA, P. V. Gold Nanoparticles for Diagnostics: Advances towards Points of Care. **Diagnostics**, v. 6, n. 4, p.43-63, 2016.

DE, M.; GHOSH, P. S.; ROTELLO, V. M. Applications of Nanoparticles in Biology. *Advanced Materials*, v. 20, n. 22. p. 4225-4241, 2008.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Química Nova*, v. 36, n. 10, 2013.

DING, J.; LU, Z.; WANG, R.; SHEN, G.; XIAO, L. Piezoelectric immunosensor with gold nanoparticles enhanced competitive immunoreaction technique for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid quantification. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 193, p.568-573, 2014.

DONG, S.; LI, J. Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors. **Bioelectrochem. Bioenerg**, v. 42, p.7-13, 1997.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D; JUNIOR, V. A.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p.88-95, 1961.

ETHERIDGE, M. L.; CAMPBELL, S. A.; ERDMAN, A. G.; HAYNES, C. L.; WOLF, S. M.; McCULLOUGH, J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 1, 2013.

FAROKHZAD, O; LANGER, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 14, p.1456-1459, 2006.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Quim. Nova**, v. 25, p. 455–464, 2002.

FERNANDES, S. C.; SOUZA, F. D.; SOUZA, B. S.; NOME, F. Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 173, p.483-490, 2012.

FERREIRA, E. S. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. 2009. 132f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2009.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p.381-389, 2003.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p.230-243, 2003.

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. **Nature** 241, 20–22, 1973.

GHOSH, P.; HAN, G.; DE, M.; KIM, C. K.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles in delivery applications☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p.1307-1315, 2008.

GUO, X.; LIN, C.; CHEN, S.; YE, R.; WU, V. C. H. A piezoelectric immunosensor for specific capture and enrichment of viable pathogens by quartz crystal microbalance sensor, followed by detection with antibody-functionalized gold nanoparticles. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 38, n. 1, p.177-183, 2012.

HANG, J., SHI, L., FENG, X., XIAO, L. Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles. **Powder Technology**, v. 192, n. 2, p. 166–170, 2009.

HERIZCHI, R.; ABBASI, E.; MILANI, M.; AKBARZADEH, A. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, v. 44, n. 2, p.596-602, 2014.

HERMANSON, G. **Bioconjugate Techniques**, 3.ed. Academic Press, 1200 p.2013.

HOPKINS, M. Imunoglobulinas, estrutura e função. *Imunologia, Microbiologia e Imunologia on-line*, 2009. Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immunoportchapter4.htm>>. Acesso em: 06 de junho de 2017.

HU, J.; WANG, L.; LI, F.; HAN, Y.L.; LIN, M.; LU, T.J.; XU, F. Oligonucleotide-linked gold nanoparticle aggregates for enhanced sensitivity in lateral flow assays. **Lab on A Chip**, v. 13, p. 4352–4357, 2013.

ISAEVA, E. I.; KIRYUKHINA, S. N.; GORBUNOVA, V. V. Photochemical synthesis of silver and gold nanoparticles in polyhydric alcohols. **Russian Journal Of General Chemistry**,

v. 83, n. 4, p.619-623, 2013.

JIA, J.; WANG, B.; WU, A.; CHENG, G.; LI, Z.; DONG, S. A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor: Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol–Gel Network. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 9, p.2217-2223, 2002.

JOKERST, J. V.; LOBOVKINA, T., ZARE, R. N. GAMBHIR, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine**, v. 6, n. 4, p.715-728, 2011.

KADNIKOVA, E. N.; KOSTIĆ, N. M. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol–gel glass. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, n. 1-3, p.39-48, 2002.

KATRUSIAK, A. E.; PATERSON, P. G.; KAMENCIC, H.; SHOKER, A.; LYON, A. W. Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl–glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts. **Journal Of Chromatography B**, v. 758, n. 2, p.207-212, 2001.

KELLY J. Understanding the Immune System How it Works. Disponível em: <http://www.imgt.org/IMGTEducation/Tutorials/ImmuneSystem/UK/the_immune_system.pdf> Acessado em 19 de abr de 2018. 54 p, 2007.

KIM, W.; CHO, H. Y.; JEONG, B.; BYUN, S.; HUH, J. D.; KIM, Y. J. Synergistic Use of Gold Nanoparticles (AuNPs) and “Capillary Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)” for High Sensitivity and Fast Assays. **Sensors**, v. 18, n. 2, p.55-77, 2017.

KOSAKA, P. M.; PINI, V.; RUZ, J. J.; SILVA, R. A.; GONZÁLEZ, M. U.; RAMOS, D.; CALLEJA, M.; TAMAYO, J. Detection of cancer biomarkers in serum using a hybrid mechanical and optoplasmonic nanosensor. **Nature Nanotechnology**, v. 9, n. 12, p.1047-1053, 2014.

KOSAKA, P. M.; PINI, V.; CALLEJA, M.; TAMAYO, J. Ultrasensitive detection of HIV-1 p24 antigen by a hybrid nanomechanical-optoplasmonic platform with potential for detecting HIV-1 at first week after infection. **PLoS ONE** 12(2): e0171899.

KUMAR, S.; GANDHI, K. S.; KUMAR, R. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method†. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 10, p.3128-3136, 2007.

KUMAR, S.; AARON, J.; SOKOLOV, K. Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p.314-320, 2008.

LAKSHMIPRIYA T.; GOPINATH, S. C. B.; HASHIM, U.; TANG, T. Signal enhancement in ELISA: Biotin-streptavidin technology against gold nanoparticles, **Journal of Taibah University Medical Sciences**, 2016.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p. 2006.

LING, K.; JIANG, H.; ZHANG, Q. A colorimetric method for the molecular weight determination of polyethylene glycol using gold nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 8 p. 538-548, 2013.

LIOPO, A.; CONJUSTEAU, A.; TSYBOULSKI, D.; ERMOLINSKY, B.; KAZANSKY, A.; ORAEVSKY, A. Biocompatible gold nanorod conjugates for preclinical biomedical research. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v.2, p.1-10, 2012.

LIPMAN, N. S.; JACKSON, L. R.; TRUDEL, L. J.; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR JOURNAL**, v. 46, p. 258-268, 2005.

LIU, X.; ATWATER, M.; WANG, J.; HUO, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 58, n. 1, p.3-7, 2007.

LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p.1103-1170, 2005.

LU, K.; KESSLER, C. Colloidal dispersion and rheology study of nanoparticles. **Journal of Materials Science**, v. 41, n. 17, p. 5613-5318, 2006.

LY, T. N.; PARK, S.; PARK, S. J. Detection of HIV-1 antigen by quartz crystal microbalance using gold nanoparticles. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 237, p.452-458, 2016.

MANDAL, A. Different functions of different parts of the antibody. Antibody Function, 2012. Disponível em: <<http://www.news-medical.net/health/Antibody-Function.aspx>>. Acesso em: 06 de Junho de 2017.

MANSON, J.; KUMAR, D.; MEENAN, B. J. Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media. **Gold Bulletin**, v. 44, n. 2, p.99-105, 2011.

MARTIN, M. M.; LINDQVIST, L. The pH dependence of fluorescein fluorescence. **Journal of Luminescence**. v. 10, p. 381-390, 1975.

MASEREEL, B., DINGUIZLI, M., BOUZIN, C., MONIOTTE, N., FERON, O., GALLEZ, B., BORGHT, T. V., MICHIELS, C., LUCAS, S. Antibody immobilization on gold nanoparticles coated layer-by-layer with polyelectrolytes. **Journal Of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 4, p.1573-1580, 2010.

MENDES, R. K. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor**. 2006. 128f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MENTI, C. Desenvolvimento de imunossensor para detecção de *Staphylococcus aureus*:

estratégias de imobilização de anticorpos. 2016.100f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) Universidade de Caxias do Sul, 2016.

MENTI, C.; HENRIQUES, A.P.; MISSELL, F.P.; ELY, M. R. Antibody-based magneto-elastic biosensors: potential devices for detection of pathogens and associated toxins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 6149-6163, 2016.

MENTI, C.; BELTRAMI, M.; POZZA, M. D.; MARTINS, S. T.; HENRIQUES, J. A. P.; SANTOS, A. D.; MISSELL, F. P.; ROESCH-ELY, M. Influence of antibody immobilization strategies on the analytical performance of a magneto-elastic immunosensor for *Staphylococcus aureus* detection. **Materials Science And Engineering: C**, v. 76, p.1232-1239, 2017.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 2^a ed, 2010.

NAZIR, S.; HUSSAIN, T.; AYUB, A.; RASHID, U.; MACROBERT, A. J. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 1, p.19-34, 2014.

NGHIEM, T. H. L.; LA, T. H.; VU, X. H.; CHU, V. H.; NGUYEN, T. H.; LE, Q. H.; FORT, E.; DO, Q. H.; TRAN, H. N. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. **Advances In Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 1, n. 2, p.025009-025013, 2010.

OH, E.; SUSUMU, K.; MÄKINEN, A. J.; DESCHAMPS, J. R.; HUSTON, A. L.; MEDINTZ, I. L. Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Coated with Multithiol-Poly(ethylene glycol) Ligands: Importance of Structural Constraints of the Sulfur Anchoring Groups. **The Journal Of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 37, p.18947-18956, 2013.

O'FARRELL, B. Lateral flow immunoassay systems: Evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays. In **The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques**, 4th ed, p. 89–107, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Global Hepatitis Report, 2017**. ISBN 978-92-4-156545-5.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Disponível em: <https://www.who.int/gho/hiv/epidemic_status/cases_all_text/en/> Acessado em abr. 2019.

PANCHOMPOO, J.; ALDOUS, L.; BAKER, M. WALLACE, M. I.; COMPTON, R. G. One-step synthesis of fluorescein modified nano-carbon for Pd(ii) detection via fluorescence quenching. **The Analyst**, v. 137, n. 9, p.2054-2062, 2012.

PAROLO, C.; ESCOSURA-MUÑIZ, A. POLO, E.; GRAZU, V.; FUENTE, D. L.; MERKOÇI, A. Design, Preparation, and Evaluation of a Fixed-Orientation Antibody/Gold-Nanoparticle Conjugate as an Immunosensing Label. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 21, p.10753-10759, 2013.

PENG, Z. G.; HIDAJAT, K.; UDDIN, M. S. Selective and sequential adsorption of bovine

serum albumin and lysozyme from a binary mixture on nanosized magnetic particles. **Journal Of Colloid And Interface Science**, v. 281, n. 1, p.11-17, 2005.

PENGO, P.; SOLOGAN, M.; PASQUATO, L.; GUIDA, F.; PACOR, S.; TOSSI, A.; STELLACCI, F.; MARSON, D.; BOCCARDO, S.; PRICL, S.; POSOCCO, P. Gold nanoparticles with patterned surface monolayers for nanomedicine: current perspectives. **European Biophysics Journal**, v. 46, n. 8, p.749-771, 2017.

POLTE, J. R., AHNER, T. T., DELISSEN, F., SOKOLOV, S., EMMERLING, F., THUNEMANN, A. F., KRAEHNERT, R. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation. **J. Am. Chem. Soc.** 132, 1296–1301, 2010.

POSSAN, A. P. Biossensor magnetoelástico para a detecção de *Escherichia coli*. 2015.105f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias) Universidade de Caxias do Sul, 2015.

POSSAN, A.L.; MENTI, C.; BELTRAMI, M.; SANTOS, A.D.; ROESCH-ELY, M.; MISSELL, F.P. Effect of surface roughness on performance of magnetoelastic biosensors for the detection of *Escherichia coli*. *Materials Science and Engineering: C*, v. 58, p. 541-547, (2016).

POZZA, M. D. Avaliação da influência de diferentes tióis no desempenho de biossensores magnetoelásticos para detecção de *Escherichia coli*. 2016.91f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias) Universidade de Caxias do Sul, 2016.

PUERTAS, S.; BATALLA, P.; MOROS, M.; POLO, E.; PINO, P.; GUISÁN, J. M.; GRAZÚ, V.; FUENTE, J. M. Taking Advantage of Unspecific Interactions to Produce Highly Active Magnetic Nanoparticle–Antibody Conjugates. **Acs Nano**, v. 5, n. 6, p.4521-4528, 2011.

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 Adv.**, v. 3, n. 17, p.6085-6094, 2013.

REGALADO, C.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochem. Rev.**, v. 3, p. 243–256, 2004.

RIBEIRO, E. M. C. Desenvolvimento de sistema de diagnóstico de dengue utilizando nanopartículas de ouro. 2015.83f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) Universidade Federal de Ouro Preto, 2015.

RIVAS, L.; MEDINA-SÁNCHEZ, M.; DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; MERKOÇI, A. Improving sensitivity of gold nanoparticle-based lateral flow assays by using wax-printed pillars as delay barriers of microfluidics. **Lab On A Chip**, p. 4406–4414, 2014.

RODRÍGUEZ-PUENTE, S.; LINACERO-BLANCO, J.; GUASCH, A. A simple and effective calibration method to determine the accuracy of liquid-handling nano-dispenser devices. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology And Crystallization Communications**, v. 69, n. 3, p.336-341, 2013.

RUZGAS, T.; CSOREGI, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. **Analytica Chimica Acta**, v. 330, n. 2-3, p.123-138, 1996.

SAHA, B.; SONGE, P.; EVERS, T. H.; PRINS, M. W. J. The influence of covalent immobilization conditions on antibody accessibility on nanoparticles. **The Analyst**, v. 142, n. 22, p.4247-4256, 2017.

SALAM, F.; ULUDAG, Y.; TOTHILL, I. E. Real-time and sensitive detection of Salmonella Typhimurium using an automated quartz crystal microbalance (QCM) instrument with nanoparticles amplification. **Talanta**, v. 115, p.761-767, 2013.

SALAMANCA-BUENTELLO, F.; PERSAD, D. L.; COURT, E. B.; MARTIN, D. K.; DAAR, A. S.; SINGER, P. A. Nanotechnology and the Developing World. **Plos Medicine**, v. 2, n. 5, p.383-386, 2005.

SCHOTT, K. L. Quantificação da glutathiona reduzida em eritrócitos humanos por cromatografia líquida de alta eficiência-UV: validação e aplicação. 2005. 100f. Dissertação (Mestre em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SHAWKY, S. M.; BALD, D.; AZZAZY, H. M. E. Direct detection of unamplified hepatitis C virus RNA using unmodified gold nanoparticles. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 13-14, p.1163-1168, 2010.

SHAWKY, S. M.; AWAD, A. A.; ALLAM, W.; ALKORDI, M. H.; EL-KHAMISY, S. F. Gold aggregating gold: A novel nanoparticle biosensor approach for the direct quantification of hepatitis C virus RNA in clinical samples. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 92, p.349-356, 2016.

SHEN, W.; MATHISON, L. C.; PETRENK, V. A.; CHIN, B. A. Design and characterization of a magnetoelastic sensor for the detection of biological agents. **Journal Of Physics D: Applied Physics**, v. 43, n. 1, p.015004-015013, 2009.

SHEN, Z.; WANG, J.; QIU, Z.; JIN, M.; WANG, X.; CHEN, Z. QCM immunosensor detection of Escherichia coli O157: H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 26, n. 7, p.3376-3381, 2011.

SILVA, A. C. S. P. Nanomedicina no tratamento de tumores sólidos: A aplicação dos lipossomas. 2014. 76f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Algarve, 2014.

SIRIWARDANA, K.; GADOGBE, M.; ANSAR, S. M.; VASQUEZ, E. S.; COLLIER, W. E.; ZOU, S.; WALTERS, K. B.; ZHANG, D. Ligand Adsorption and Exchange on Pegylated Gold Nanoparticles. **The Journal Of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 20, p.11111-11119, 2014.

SPADAVECCHIA, J.; MOVIA, D.; MOORE, C.; MAGUIRE, C. M.; MOUSTAOU, H.; CASALE, S.; VOLKOV, Y.; PRINA-MELLO, A. Targeted polyethylene glycol gold

nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer: from synthesis to proof-of-concept in vitro studies. **International Journal Of Nanomedicine**, p.791-822, 2016.

STANFIELD, R. L. Determination of Antibody Structures. In: OSSIPOV, V. e FISCHER, N. *Monoclonal Antibodies*: Humana Press, v.1131 cap. 23, p.395-406. 2014.

SVENSON, S. What nanomedicine in the clinic right now really forms nanoparticles? **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 6, n. 2, p.125-135, 2014.

SUN, J.; XIANYU, Y.; JIANG, X. Point-of-care biochemical assays using gold nanoparticle-implemented microfluidics. **Chem. Soc. Rev.** V. 43, p. 6239–6253, 2014.

TAKAE, S.; AKIYAMA, Y.; OTSUKA, H.; NAKAMURA, T.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. Ligand Density Effect on Biorecognition by PEGylated Gold Nanoparticles: Regulated Interaction of RCA120Lectin with Lactose Installed to the Distal End of Tethered PEG Strands on Gold Surface. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p.818-824, 2005.

TAN, G.; KANTNER, K.; ZHANG, Q.; SOLIMAN, M. G.; PINO, P. PARAK, W. J.; ONUR, M. A.; VALDEPEREZ, D.; REJMAN, J.; PELAZ, B. Conjugation of Polymer-Coated Gold Nanoparticles with Antibodies—Synthesis and Characterization. **Nanomaterials**, v. 5, n. 3, p.1297-1316, 2015.

TOMA, H. E., ZAMARION, V. M., TOMA, S. H., ARAKI, K. The Coordination Chemistry at Gold Nanoparticles. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 21, n. 7, 1158–1176, 2010.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions Of The Faraday Society**, v. 11, p.55-75, 1951.

UECHI, I., YAMADA, S. Photochemical and analytical applications of gold nanoparticles and nanorods utilizing surface plasmon resonance. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 7, p.2411-2421, 2008.

ULUDAG, Y.; TOTHILL, I. E. Cancer Biomarker Detection in Serum Samples Using Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Sensors with Nanoparticle Signal Amplification. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 14, p.5898-5904, 2012.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, 65, 249–259, 2004.

WANG, W.; WEI, Q.; WANG, J.; WANG, B.; ZHANG, S.; YUAN, Z. Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or coagulant?. **Journal Of Colloid And Interface Science**, v. 404, p.223-229, 2013.

WANG, A.; NG, H. P.; XU, Y.; LI, Y.; ZHENG, Y.; YU, J.; HAN, F.; PENG, F.; FU, L. Gold Nanoparticles: Synthesis, Stability Test, and Application for the Rice Growth. **Journal Of Nanomaterials**, v. 2014, p.1-6, 2014.

WONG, C. R.; TSE, H. Y. **Lateral Flow Immunoassay**. Springer 2009.

ZHAN, L.; WU, W. B.; YANG, X. X.; HUANG, C. Z. Gold nanoparticle-based enhanced ELISA for respiratory syncytial virus. **New J. Chem.**, v. 38, n. 7, p.2935-2940, 2014. Royal Society of Chemistry.

ZHENG, B.; CHENG, S.; LIE, W.; LAM, M. H. W.; LIANG, H. Small organic molecules detection based on aptamer-modified gold nanoparticles-enhanced quartz crystal microbalance with dissipation biosensor. **Analytical Biochemistry**, v. 438, n. 2, p.144-149, 2013.

ZHENG, Longtang *et al.* Detection and differentiation of influenza viruses with glycan-functionalized gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p.46-52, 2017.