



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JAIRO PINTO DE OLIVEIRA

ESTUDO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E
BIOCONJUGAÇÃO COM PROTEÍNAS PARA DESENVOLVIMENTO DE
NANOSSENSORES

Vitória – ES

2016

JAIRO PINTO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E
BIOCONJUGAÇÃO COM PROTEÍNAS PARA DESENVOLVIMENTO DE
NANOSENSORES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) - Ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Marco Cesar C. Guimarães

Co-Orientador: Breno Valentim Nogueira

Vitória – ES

2016

JAIRO PINTO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E
BIOCONJUGAÇÃO COM PROTEÍNAS PARA DESENVOLVIMENTO DE
NANOSENSORES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) - Ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: ___ / ___ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-Orientador

Prof. Dr. André Romero da Silva
Instituto Federal do Espírito Santo
Examinador Externo

Prof. Dr. Kildare Miranda
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador Externo

Prof. Dr. Fábio Olivares
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Examinador Externo

À Betânia Pinto de Oliveira (*in
memorian*) pelo exemplo de
vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela certeza de não estar sozinho. Na solidude da alma ainda ouço: “Sê valente!”

À minha eterna namorada Maíra Oliveira por tornar os meus dias mais felizes. Obrigado por compartilhar sua vida comigo e por ter realizado meu sonho de ser pai. Arthur está chegando e vai alegrar ainda mais as nossas vidas.

Aos meus pais (Márcia e Euclides), pela minha educação e pelo amor demonstrado. Aos meus irmãos Natan, Junim e Betânia (*in memoriam*) vitalícios exemplos de cumplicidade.

À Tia Aline, indispensável para que eu chegasse até aqui. Minha gratidão é infinita.

Aos professores Marco Cesar Cunegundes Guimarães e Breno Valentim Nogueira, exemplos de pesquisadores, pela orientação, confiança e apoio no desenvolvimento deste trabalho. Minha formação como pesquisador foi de excelência pelos mestres que tive.

Aos Professores Dr. André Romero, Dr. Kildare Miranda e Dr. Fábio Olivares pela participação da banca e pela pertinência e qualidade das contribuições ao texto.

Ao Dr. Adilson R Prado, amigo de longa data, pelas nobres discussões em relação ao fundamento desta tese e pela disponibilidade 24 hs em prol do conhecimento. Muito obrigado pelo apoio durante esta jornada. Tamojunto!

Ao Wanderson J Keijok, escudeiro fiel, pelo trabalho exemplar desempenhado no LUCAR. Sua participação nesta tese foi fundamental para a qualidade dos resultados. Obrigado por tudo!

A Hélio Santos Sá, pela amizade, cumplicidade e pelo aprendizado na maestria em que desenvolve seu trabalho.

À equipe atual e anterior do LUCAR por todo o aprendizado, tenho certeza que a convivência com vocês tornou os meus dias mais agradáveis: Suely, Christine, Rayssa, Rafaela, Afrânio, Tadeu, Andressa, Danilo, Bárbara, Débora, Brunelli, Juliana, Hugo, Gabriel, Gabriela, Natália, Mateus, Rodolpho, Mário, Gisele, Ricardo, Arícia, Emilane, Flávia, Ingrid, Isadora, Laryssa, Luis Contreras, Valmara, Vinícius, Isabela ...

Aos Laboratórios parceiros, LUCAR (UFES), LABPETRO (UFES), LABIOM (UFES), IMUNOBIOLOGIA (UFES), LABSAN (UFES), LABTEL (UFES), Química (IFES-Serra), Química (IFES-Vitória), Química (IFES-Aracruz).

Ao apoio institucional da Universidade Federal do Espírito Santo e do Departamento de Morfologia.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

A FAPES pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

O rápido desenvolvimento em nanotecnologia durante as últimas décadas oferece amplas perspectivas no uso de materiais em nanoescala para diferentes áreas da indústria, tecnologia e medicina. No entanto, sua utilização segura e eficiente requer um controle minucioso sobre as propriedades físico-químicas e suas interações moleculares relacionados à interface biológica. A comunidade científica concorda que existe uma lacuna considerável sob nossa compreensão na aplicação desses nanomateriais, onde a maioria dos processos de síntese de nanopartículas coloidais é pouco compreendida em termos do seu mecanismo de crescimento. Além do mais, a interação de nanopartículas metálicas com biomoléculas também é pouco explorada, permanecendo como um grande desafio devido à natureza heterogênea desses conjugados. Desta forma, este projeto teve como objetivo a investigação dos principais mecanismos que afetam o controle do tamanho e a monodispersividade das nanopartículas metálicas, assim como a modificação de sua superfície química e interação com proteínas para aplicações em nanosensores. Esta tese está dividida em quatro etapas, sendo a primeira o desenvolvimento de um método para síntese de nanopartículas de ouro monodispersas, a segunda etapa aborda a modificação química da superfície desses nanomateriais e o seu estudo pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão. A terceira parte apresenta um estudo detalhado sobre a estabilidade e o acoplamento covalente com proteínas, utilizando a albumina sérica bovina como proteína-modelo. A quarta e última etapa é um estudo de bioconjugação com anticorpos avaliando a melhor estratégia para detectar o 17β -estradiol por Ressonância Plasmonica de Superfície Localizada. Estas abordagens visam o estabelecimento de uma rota confiável e reprodutível para a produção de nanobioconjugados a partir de nanopartículas de ouro. Esperamos, assim, poder maximizar o sucesso de aplicações de nanomateriais em sistemas biológicos bem como subsidiar o desenvolvimento de plataformas versáteis e reprodutíveis em nanobiotecnologia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema detalhado mostrando a relação da escala de tamanho de nanopartículas (por exemplo, lipossomas, dendrímeros, *nanoshells*, *quantum dots* e polímeros), em comparação com outros materiais (parte de cima). Adaptado de National Cancer Institute [21].....26
- Figura 2.** Cálice de *Lycurgus* do século 4 dC, aparece verde quando iluminado na parte da frente, e vermelho quando iluminado na parte de trás. Adaptado de [26].....27
- Figura 3.** Mecanismo geral de crescimento da síntese Turkevich deduzido por Polte [27]. Neste método, o precursor de ouro é reduzido pela reação de redução com o citrato de sódio, podendo crescer pela condensação de átomos de ouro sobre as suas superfícies e também pela coagulação com outras partículas.....29
- Figura 4.** Tabela de classificação de nanopartículas plasmônicas. A classificação foi feita com base em parâmetros geométricos. Cada linha representa um nível diferente de dimensionalidade e complexidade, tais como esféricas (1,2), semelhante a haste (3 a 9), poligonais (10 a 16), poliédricas (17 a 23), ramificadas (24 a 29), estruturas mais complexas (30 a 36) e estruturas ocas (37 a 43). Em cada linha, a ordem geométrica das estruturas (em termos de relação de aspecto, número de lados e facetas, ou número de ramos) aumenta a partir da esquerda para a direita. Adaptado de [59].....31
- Figura 5.** Representação esquemática das oscilações de carga de superfície induzida causadas por um campo de luz externa e possíveis respostas espectroscópicas para a detecção de biomoléculas sensíveis. A luz interage com a nanopartícula levando a absorção e dispersão da radiação incidente. LSPR – Ressonância plasmônica de superfície localizada; SERS – Espalhamento Raman intensificado por superfície; MEF – Fluorescência intensificada pelo metal. Adaptado de [60].....32
- Figura 6.** Esquema mostrando a ressonância plasmônica de superfície localizada em nanopartículas metálicas.....33
- Figura 7.** Exemplo do deslocamento dos espectros de nanopartículas metálicas em função das dimensões. Adaptado de [77].....35
- Figura 8.** Esquema simplificado mostrando a formação de monocamadas auto-organizadas. Moléculas de tiol organizam uma estrutura estável em superfícies de ouro devido a forte afinidade entre *headgroups* de enxofre e o ouro [82].....37
- Figura 9.** Diagrama esquemático mostrando SAM's de alcanotóis sobre a superfície cristalina de ouro. As características estão realçadas. Adaptado de [78].....38

Figura 10. Nanopartícula de ouro com 5 nm de diâmetro com diferentes moléculas de ligantes desenhadas em escala real. A partícula é idealizada como uma esfera lisa. Da esquerda para a direita: ácido mercaptoacético (MAA), ácido mercaptopropiônico (MPA), ácido mercaptoundecanóico (MUA), ácido mercaptossuccínico (MSA), ácido dihidrolipídico (DHLLA), trifetilfosfina bi-sulfonada, mPEG₅SH, mPEG₄₅SH (2000 g.mol⁻¹) e um curto peptídeo da sequência CALNN. Adaptado de [79].....39

Figura 11. Representação esquemática de uma nanopartícula com 5 nm diâmetro de núcleo e 10 nm de diâmetro com a camada orgânica (PEG 5000 g.mol⁻¹). As biomoléculas representadas são: estreptavidina (verde), transferrina (azul), anticorpos (IgG, roxo), albumina (vermelho), DNA de cadeia simples e outras biomoléculas para compor o espaço. As estruturas cristalinas das foram obtidas em escala a partir do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Adaptado de [79].....42

Figura 12. Reação de conjugação comum para nanopartículas funcionalizadas com ácido carboxílico (a). A corbodiiimida (EDC) forma um intermediário instável, chamado grupo carboxílico "ativado", podendo hidrolisar ou reagir com um grupo amino primário, sob formação de uma ligação amida estável. Opcionalmente, pode reagir com NHS ou sulfo-NHS. O éster ativo tem uma semi-vida prolongada e também reage com aminas primárias. Nanopartículas com grupos amino primários com compostos de ésteres ativos para formar ligações amida (b). Sulfo-SMCC é um reticulador heterobifuncional com um grupo sulfo-NHS e uma função de maleimida na outra extremidade que é reativo com os grupos tiol. Adaptado de [79].....43

Figura 13 - Esquema de uma imunoglobulina, as duas cadeias leves em rosa e as duas cadeias pesadas em vermelho (a); Modelo tridimensional de um anticorpo obtido a partir de cristalografia de raios - X (b); Adaptado de [126].....46

Figura 14 - Representação esquemática das quatro diferentes orientações dos anticorpos nas superfícies. Orientação "Extremidade" (Fc ligado ao substrato (a) e orientação "Plano" (todos os três fragmentos ligados ao substrato) (d); A orientação dos anticorpos permite manter a sua funcionalidade. Contudo, esta reatividade é comprometida com o orientação "cabeça" (Fabs ligado ao substrato) (b) e orientação "lado" (um Fc e um Fab ligado ao substrato) (c); Adaptado de [126].....47

Figura 15. Esquema mostrando o procedimento da biomarcação de tecido com *immunogold* para visualização da lisozima humana por microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de [144].....48

Figura 16. Imagens de fluorescência e SERS obtidas de células HEK293 normais e células HEK293 expressando PLC γ 1 (cancerosas). (a) Célula normal - Imagem de campo claro (à esquerda) e fluorescência (à direita); (b) Célula normal - Imagens SERS campo claro (esquerda) e mapeamento Raman (à direita); (c) Célula normal - mapeamento Raman. Manchas coloridas indicam os pontos de laser através do meio da célula ao longo do eixo Y; (d) Célula cancerosa - Imagem de campo claro (à esquerda) e fluorescência (à direita); (e) Célula cancerosa - Imagens SERS campo claro (esquerda) e mapeamento Raman (à direita); (f) Célula cancerosa - Mapeamento Raman. Manchas coloridas indicam os pontos de laser através do meio da célula ao longo do eixo Y. Adaptado de [161].....50

Figura 17. Esquema mostrando várias estratégias para a aplicação de nanopartículas em sistemas biológicos. Em (a) é mostrado moléculas que podem ancorar diretamente na superfície do nanocristal ou com os ligantes a ele associado. Em (b) é apresentado a possibilidade do uso de polímeros ou ligantes que são utilizados para estabilizar o coloide, como o polietilenoglicol (PEG) ou cadeias zwitteriônicas que interagem fortemente com as moléculas de água e evitar adsorção inespecífica. Em (c) pode ser observado a possibilidade de acoplamento covalente por biomoléculas que apresentam grupos reativos. A parte representada em (d) mostra as unidades biofuncionais que podem conferir o reconhecimento, a capacidade terapêutica, a capacidade sensora e outras características desejáveis. Adaptado de [166].....51

ARTIGO I

Figure 1. UV-vis absorption spectroscopy measurements of the colloidal gold nanoparticles synthesized with sodium citrate (A) and borohydride (B) in different concentrations (0.067, 0.133 and 0.200 % w/v) and times (5, 10 and 15 min).....67

Figure 2. TEM images of gold nanoparticles (with a reaction time of 10 minutes) produced with different concentrations of citrate; 0.067 % (A); 0.133% (C) and 0.200 % (E); and borohydride 0.067 % (H); 0.133% (J) and 0.200 % (L); Scale bar 100 nm and 10 nm inset. The corresponding histograms (B, D, F and I, K, M) and UV-Vis absorbance levels of the evaluated conditions, Cit-AuNPs (G) and BH-AuNPs (N).....69

Figure 3. TEM images of gold nanoparticles (with the average concentration of the precursor) produced with citrate: 5 min (A); 10 min (C) and 15 min (E); and borohydride: 5 min (H); 10 min (J) and 15 min (L); Scale bar 100 nm and 10 nm (inset). The corresponding histograms are shown beneath (B, D, F and I, K, M) and UV-Vis spectrum showing different absorbance levels of the evaluated conditions, Cit-AuNPs (G) and BH-AuNPs (N).....70

Figure 4. Energy dispersive spectroscopy on the scanning electron microscope (EDS-SEM). EDS analysis of gold nanoparticles synthesized from sodium citrate (A) and borohydride (B), inset shows EDS analysis area. EDS map showing detection of gold (yellow and orange), chloride (purple), sodium (cyan), oxygen (green) and carbon (red). Scale bars: 30 μ m.....71

Figure 5 - Concept behind absorption spectra of gold nanoparticles with different dispersity. Low FWHM indicates monodispersity, while higher values indicate polydispersity of particles.....72

Figure 6. Three-dimensional response surface plot for bandwidth values at half height for Cit-AuNPs and BH-AuNPs by the influence of time and concentration (A and E). Pareto's chart representing the effects values from ANOVA for relative impact of concentration and time on Cit-AuNPs (B) and BH-NPs (F). Time and concentration influence on Cit-AuNPs (C and D) and BH-AuNPs (G and H).....76

Figure 7 – Multiple histograms in same plot shows the effect of concentration in size distribution of AuNPs with synthesis time fixed at 10 minutes. Cit-AuNPs (A) and BH-AuNPs (B).....78

Figure 8 – Multiple histograms in same plot shows the effect of time synthesis in size distribution of AuNPs with concentration fixed at 0.133 % (w/v). Cit-AuNP's (A) and BH-AuNP's (B).....79

ARTIGO II

Figura 1. Imagens mostrando a sequência de como as grades foram preparadas. Primeiro passo é demonstrado em A, onde a suspensão coloidal de AuNP's foi gotejada no centro de uma lamina de vidro histológica; após um tempo de repouso, verifica-se a formação do anel de café nas bordas da gota (B-D); uma grade previamente coberta com polímero hidrofóbico formvar é colocada sobre a gota (E); A grade é arrastada cuidadosamente sobre todo o anel formado para recuperar o máximo possível de AuNP's (F). Detalhes do arraste da grade sobre a borda formada podem ser visualizados nas imagens G-I.....86

Figura 2. Esquema do mecanismo que afeta o processo de secagem. Duas forças capilares estão ativas: o efeito do anel de café transporta coloides para fora enquanto o fluxo de Marangoni neutraliza esse efeito. Na prática, o efeito do anel de café é superior em soluções aquosas. Todas as forças capilares são independentes do substrato.....88

Figura 3. Ilustração esquemática mostrando o diâmetro da partícula (d) e a distância entre os núcleos metálicos (D) promovida pela espessura da esfera de coordenação à medida que aumenta o comprimento do ligante; Da esquerda pra direita: AuNP's sem ligantes; AuNP's – MPA com espaçamento de 3 carbonos; AuNP's – MUA com espaçamento de 11 carbonos e AuNP's-MHA com espaçamento de 16 carbonos.....89

Figura 4. Exemplos de imagens de AuNP's (sem ligantes), AuNP's com ácido mercaptopropiônico (AuNP's-MPA), AuNP's com ácido mercaptoundecanóico (AuNP's-MUA) e AuNP's com ácido mercaptohexadecanóico (AuNP's-MHA), obtidas por microscopia eletrônica de transmissão utilizadas para a determinação do espaçamento entre as partículas.....90

Figura 5. Exemplos de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão para determinação do espaçamento entre as partículas utilizando o software Digital Micrograph. AuNP's sem ligantes (A), AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptopropanóico (AuNP's-MPA) (C), AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptoundecanóico (AuNP's-MUA) (E), AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptohexadecanóico (AuNP's-MHA) (G); A linha branca mostra a demarcação onde os dados de espaçamento foram obtidos em cada imagem. Histogramas mostrando o espaçamento regular entre as partículas para todos os ensaios na ordem correspondente (B,D,F,H).....91

Figura 6. Histograma mostrando o espaçamento entre as nanopartículas de ouro funcionalizadas com diferentes espaçadores utilizados (A); Gráfico mostrando os desvios encontrados para cada espaçador (B), ácido mercaptopropiônico (MPA), ácido mercaptoundecanóico (MUA) e ácido mercaptohexadecanóico (MHA) e nanopartículas de ouro sem ligantes (AuNP's).....92

Figura 7. Dependência do comprimento da cadeia na espessura da esfera de coordenação promovida pelos diferentes comprimentos de cadeia dos ligantes mercaptocarboxílicos utilizados.....93

Figure 8. Histograma de distribuição de nanopartículas de ouro com diferentes ligantes utilizados. No eixo das abcissas temos os tamanhos das nanopartículas (em nm) e no eixo das ordenadas, temos a porcentagem (Frequência relativa) de partículas que situam nas respectivas faixas de tamanho. AuNP's (A); AuNP's - MPA (B); AuNP's – MUA (C); AuNP's – MHA (D).....94

ARTIGO III

Figura 1. Espectroscopia de absorção UV-Visível para o coloide de ouro sintetizado mostrando o pico plasmônico característico em 522 nm (A); Composição elementar realizada por EDS (B); Padrão de difração de raios-x (C); Histograma mostrando a distribuição gaussiana de diâmetro e a razão de aspecto (RA) de 500 partículas obtidas por imagens feitas de microscopia eletrônica de transmissão (D); Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (E-I) em diferentes magnificações mostrando o tamanho e a distribuição das nanopartículas sintetizadas. Barra de escala 100 nm (E e F) e 10 nm (G-I).107

Figura 2. Esquema representativo mostrando a funcionalização de uma nanopartícula de ouro com um ligante mercaptocarboxílico, nesse caso, o ácido mercaptoundecanóico com grupos SH e COOH em cada uma das extremidades.....109

Figura 3. Espectroscopia de absorção UV/Vis normalizada de AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptopropanóico (MPA), ácido mercaptoundecanóico (MUA) e ácido mercaptohexadecanóico (MHA) após 100 horas de agitação (800rpm). O espectro de absorção das AuNP's utilizadas como controle é apresentado em preto; AuNP's-MPA (vermelho); AuNP's-MUA (azul) e AuNP's-MHA (verde). O detalhe na figura apresenta o deslocamento da banda em cada um dos ligantes. AuNP's-MPA (1,0 nm); AuNP's-MUA (3 nm); AuNP's-MHA (5nm).....110

Figura 4. Dependência do comprimento da cadeia no deslocamento de pico espectral LSPR.....111

Figura 5. Espectro de Infra-Vermelho de nanopartículas metálicas funcionalizadas com os ligantes após 100 horas de agitação (800 rpm). Na cor preta é mostrado o ligante como controle e na cor azul é o espectro das AuNP's após a funcionalização. MPA – ácido mercaptopropanóico; MUA – ácido mercaptoundecanóico e MHA – ácido mercaptohexadecanóico.....112

Figura 6. Espectro Raman de AuNP's e os ligantes após 100 horas de agitação (800 rpm) e temperatura ambiente (25°C). AuNP's controle sem ligantes (preto). AuNP's-MPA (vermelho); AuNP's-MUA (azul) e AuNP's-MHA (verde) (A); Imagens de microscopia de força atômica (mapa Raman) para as nanopartículas de ouro controle – AuNP's (B); e AuNP's-SAMs: AuPs-MPA (C), AuNP's-MUA (D) e AuNP's-MHA (E).....114

Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para as nanopartículas de ouro controle – AuNP's (A); e nanopartículas de ouro ligadas com os ligantes mercaptocarboílicos: AuPs-MPA (B), AuNP's-MUA (C) e AuNP's-MHA (D). Barra de escala 10 nm.....115

Figura 8. Medições da carga de superfície pelo potencial zeta para nanopartículas de ouro com diferentes ligantes utilizados.....116

Figura 9. Espectro de Absorção mostrando o coloide de ouro com os ligantes em diferentes faixas de pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 10,0) e o controle (sem alteração no pH do meio). AuNP's sem ligantes (A); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptopropanóico (MPA) (B); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptoundecanóico (MUA) (C); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptohexadecanóico (MHA) (D).....118

Figura 10. Parâmetro de Floculação em relação ao pH do ouro coloidal com diferentes ligantes.....119

Figura 11. Espectro de absorção mostrando o coloide de ouro com os ligantes em diferentes concentrações de NaCl (0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 mM). AuNP's sem ligantes (A); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptopropanóico (MPA) (B); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptoundecanóico (MUA) (C); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptohexadecanóico (MHA) (D).....120

Figura 12. Parâmetro de Floculação em relação a concentração de sais no ouro coloidal com diferentes ligantes.....121

Figura 13. Esquema dos principais caminhos que podem estar envolvidos no mecanismo de ativação de grupos COOH por acoplamento carbodiimida (EDC) assistida ou não por NHS.....122

Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência na detecção de BSA (A) para excitação em 280 nm e curva padrão obtida nas concentrações de 0,1 a 2 $\mu\text{mol/L}$ (B) e 2,5 a 60 nmol/L (B e C).....123

Figura 15. Efeito da razão molar entre o ativador de ácido carboxílico (EDC) e o NHS (estabilizante) no acoplamento de proteínas na superfície das nanopartículas metálicas de ouro.....123

Figura 16. Influência do comprimento do espaçador na imobilização e proteínas (BSA). MPA, ácido mercaptopropiônico, comprimento do espaçador: 3 átomos de carbono; Ácido mercaptoundecanóico (MUA), comprimento do espaçador: 11 átomos de carbono; MHA, ácido mercaptohexadecanóico, comprimento do espaçador: 16 átomos de carbono.....124

Figura S1. Espectros de absorção UV/Vis de nanopartículas metálicas submetidas a diferentes condições de centrifugação: 86 g (A); 344 g (B), 2.152 g (C); 8.608 g (D) e 16.873 g (E). Linhas pontilhadas são referentes à fração superior (sobrenadante) após a centrifugação e linhas contínuas são referentes ao pellet ressuspensionado em água ultrapura. Cores: preto (5 min), azul (10 min) e vermelho (20 min).....130

Figura S2. Esquema apresentando a influência da razão de aspecto na esfericidade da partícula.....131

Figura S3. Exemplos de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão utilizadas para cálculo da determinação de razão de aspecto utilizando o *software* Digital micrograph. Os valores correspondentes ao diâmetro maior e menor são identificados nas imagens. A, B, C, D, E, F. Barra de escala 50 nm.....132

ARTIGO IV

Figura 1 - Espectroscopia de absorção UV-Visível para o coloide de ouro sintetizado mostrando o pico plasmônico característico em 522 nm (A); Padrão de difração de raios-x, os picos característicos de nanocristais podem ser observados (B); Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão em diferentes magnificações mostrando o tamanho e a distribuição das nanopartículas sintetizadas. Barra de escala 100 nm (C,D) e 10 nm (E,F).....139

Figura 2 – Espectroscopia de absorção UV/Vis normalizada de AuNP's em preto e AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptoundecanóico (MUA) em azul (A). O detalhe na figura apresenta o deslocamento da banda provocado pela ligação do MUA com a superfície do metal; Espectro de Infra-Vermelho do ligante utilizado (MUA) e das AuNP's funcionalizadas apresentando os picos característicos sobrepostos (B); Espectro Raman de AuNP's (preto) e AuNP's-MUA (azul) com os picos correspondentes a vibrações simétricas e assimétricas do citrato para AuNP's controle (preto) e o aparecimento de um pico em 1106 cm^{-1} referente a uma vibração S-C para AuNP's-MUA (C).....140

Figura 3 – Espectro de emissão de fluorescência na detecção da molécula do anticorpo primário do tipo IgG (Anti-17 β estradiol) com excitação de fótons realizada em 280 nm e

varrimento da emissão de 290 a 500 nm (A); Curva padrão realizada utilizando λ 350 nm (emissão) das concentrações de 0,11 a 14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B).....141

Figura 4 – Espectro de emissão de fluorescência na detecção da molécula do anticorpo secundário marcado com fluoróforo (Alexa Fluor 750) anti Fab de IgG com excitação em 745 nm e varrimento da emissão de 755 a 875 nm (A); Curva padrão obtida em λ 770 nm (emissão) das concentrações de 0,08 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B).....141

Figura 5. Possibilidades de reconhecimento da porção Fab pelo anticorpo secundário. O ac pode se ligar a um sítio apenas ou aos dois sítios Fab de IgG simultaneamente, podendo haver as configurações ac primário: ac secundário (1:1 / 1:2).....142

Figura 6. Comparação da quantidade de anticorpos anti-17 β estradiol ligados com a quantidade de anticorpos orientados na superfície metálica das AuNP's pelas diferentes estratégias de conjugação avaliadas (Adsorção física e ligação covalente). A taxa de anticorpos ligados foi determinada pela fluorescência intrínseca dos aminoácidos presentes na estrutura dos anticorpos do tipo IgG (Excitação 280 / emissão 350 nm) e a taxa de anticorpos orientados foi determinada pelo uso de anticorpos secundários anti Fab Alexa Fluor 750.....143

Figura 7. Ilustração descrevendo a formação de superestruturas com nanopartículas de ouro envolvendo o reconhecimento da porção Fab do anticorpo primário ancorado na superfície metálica por meio de um anticorpo secundário anti Fab de IgG marcado com uma nanopartículas de ouro 5nm.....143

Figura 8 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão apresentando várias combinações possíveis de acordo a orientação do anticorpo primário ancorado na superfície metálica. As superestruturas são formadas por meio do reconhecimento de sítios Fab pelo *immunogold* (5nm). Imunoconjugados preparados por adsorção física (A-G) e imunoconjugados preparados por conjugação covalente por meio do ligante ácido mercaptoundecanóico (H-N).....144

Figura 9 – Espectros de absorção das soluções de AuNP's conjugadas por adsorção física com anticorpos anti-17 β estradiol sob diferentes concentrações de 17 β –estradiol (A); Curva de calibração típica para detecção do 17 β -estradiol com imunoconjugados preparados por adsorção física (B); Espectros de absorção das soluções de AuNP's conjugadas por ligação covalente com anticorpos anti-17 β estradiol sob diferentes concentrações de 17 β –estradiol (C); Curva de calibração típica para detecção do 17 β -estradiol com imunoconjugados preparados com o uso de ligantes para a conjugação covalente (D).....146

Figura 10. Comparação da evolução do deslocamento do lambda máximo (nm) em função do aumento da concentração de 17 β –estradiol (ng.mL^{-1}) para as diferentes estratégias de conjugação avaliadas (Adsorção física e ligação covalente) (B).....147

Figura 11. Cromatogramas obtidos na detecção do 17 β -estradiol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (A) e curva padrão (B). Condições de operação: detector PDA 282 nm, Fluxo 0,5 mL/min, eluição isocrática H₂O:ACN (60:40%).....147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das classes de Ig. Adaptado de The McGraw-Hill Companies, [122,123].....	45
---	----

ARTIGO I

Table 1. Experimental factors and levels in the central composite design.....	66
--	----

Table 2. Data of 3 ² factorial planning.....	73
--	----

TABLE 3. ANOVA of nanoparticles' synthesis.....	74
--	----

ARTIGO II

Tabela 1. Dados dos ligantes utilizados como espaçadores para reações de acoplamento.....	85
--	----

Tabela 2. Dados da espessura da monocamada de AuNP's modificadas com mercaptocarboxílicos de vários comprimentos de cadeia.....	93
--	----

Tabela 3. Valores referentes ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas com e sem ligantes obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e valores da medição da carga de superfície obtidas pelo potencial zeta.....	95
---	----

Tabela 4. Comparação entre a espessura da esfera de coordenação determinada por diferentes técnicas.....	95
---	----

Tabela S1. Valores correspondentes ao espaçamento de 500 nanopartículas de ouro (AuNP's) sem a utilização de ligantes obtidos pelo <i>software</i> Digital Micrograph.....	99
---	----

Tabela S2. Valores correspondentes ao espaçamento de 500 nanopartículas de ouro com o ligante ácido mercaptopropiônico (AuNP's-MPA) obtidos - <i>software</i> Digital Micrograph.....	99
--	----

Tabela S3. Valores correspondentes ao espaçamento de 500 nanopartículas de ouro com o ligante ácido mercaptoundecanóico (AuNP's-MUA) - <i>software</i> Digital Micrograph.....	100
---	-----

Tabela S4. Valores correspondentes ao espaçamento de 500 nanopartículas de ouro com o ligante ácido mercaptohexadecanóico (AuNP's-MHA) - <i>software</i> Digital Micrograph.....	100
---	-----

ARTIGO III

Tabela 1. Dados dos ligantes com grupamento tiol utilizados como espaçadores para reações de acoplamento.....105

Tabela 2. Dados do deslocamento do comprimento de onda máximo da absorção.....111

Tabela 3. Valores referentes ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas com e sem ligantes obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS).....115

Tabela S1. Valores obtidos pelo espectro de absorção UV-Vis para determinação do tempo e rotação ideal de centrifugação sem perda de material.....129

Tabela S2. Valores correspondentes a razão de aspecto de 500 nanopartículas metálicas obtidos diretamente no *software* Digital Micrograph da Gatan.....131

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

x	Coeficiente
%	Percentual
Ac	Anticorpos
ANOVA	Análise de Variância
Au	Ouro
AuNP's	Nanopartículas de ouro
BH ⁻	Borohidreto
BH-AuNP's	Nanopartículas de ouro sintetizadas com borohidreto de sódio
BSA	Albumina sérica bovina
CCD	<i>Central composite design</i>
Cit	Citrato
Cit-AuNP's	Nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato e sódio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COOH	Ácido carboxílico
cv	Coeficiente de variação
DF	<i>Degrees of Freedom</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DHLA	Ácido dihidrolípido
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difratometria de raios-x
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDS	<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>
ε	<i>Random transgression</i>
F	test statistic
Fab	Fração de ligação ao antígeno
Fig.	Figura
FT	Transformada de Fourier
FWHM	<i>Full-width at half-maximum</i>
g	Força g

g	Gramas
h	Horas
HAuCl ₄	Ácido tetracloroáurico
hCG	Hormônio gonadotrofina coriônica humana
HCl	Ácido clorídrico
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HNO ₃	Ácido nítrico
ICP-MS	Plasma indutivamente acoplado a um espectrômetro de massas
IgG	Imunoglobulina G
IV	Infravermelho
J	Joules
Kev	Kiloeletronvolt
kDa	Kilodaltons
kJ	KiloJoules
kV	Kilovolt
L	Linear
LSPR	Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada
M	Molar
MAA	Ácido mercaptoacético
MEF	Fluorescência intensificada pelo metal
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MHA	Ácido mercaptohexadecanóico
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPA	Ácido mercaptopropanóico
MS	<i>Mean Square</i>
MSA	Ácido mercaptosuccínico
MUA	Ácido mercaptoundecanóico
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Citrato trissódico

NHS	N-hidroxissuccinamida
NLO	Propriedades ópticas não-lineares
nm	nanômetros
NP's	Nanopartículas
°C	Grau Celsius
p	<i>p value</i>
PDA	Arranjo de Fotodiodos
PEG	Poli(etil)enoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
pKa	Constante de ionização de um ácido
Q	<i>Quadratic</i>
r ²	<i>coefficient of determination</i>
RMN	Ressonancia magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
RSM	<i>Response surface modelling</i>
S/L	Sem ligantes
SAM's	<i>Self-assembled monolayers</i>
ScFv	<i>Single chain fragment variable</i>
SERS	Espalhamento Raman intensificado por superfície
SH	Tiol
SMCC	Succinimidil-4- (N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície
SQ	<i>Sum of Squares</i>
µg	microgramas
µL	microLitros
µM	microMolar
UV-Vis	Ultravioleta – Visível
β	<i>Beta</i>
θ	<i>Teta</i>
λ	<i>Lambda</i>

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA TESE	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
3. REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 NANOMATERIAIS E NANOTECNOLOGIA	26
3.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO	27
3.2.1 Mecanismos de Formação de AuNP's	28
3.3 PROPRIEDADES DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	32
3.4 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE QUÍMICA	36
3.5 CONJUGAÇÃO COM PROTEÍNAS	41
3.5.1 Conjugação com Anticorpos	45
3.6 APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA	48
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ARTIGO I	62
RESUMO	62
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. EXPERIMENTAL	64
2.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	64
2.2 CARACTERIZAÇÃO	65
2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	66
3.2 OTIMIZAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
4. CONCLUSÕES	79
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ARTIGO II	82
RESUMO	82
1. INTRODUÇÃO.....	83

2. EXPERIMENTAL	84
2.1 REAGENTES E INSTRUMENTOS	84
2.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE AuNP's	84
2.3 AUTO-MONTAGEM LIGANTES TIOL	85
2.4 PREPARO DE AMOSTRA PARA MET.....	85
2.5 DETERMINAÇÃO DO ESPAÇAMENTO	87
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.1 PREPARO DA AMOSTRA PARA MET	87
3.2 DETERMINAÇÃO DO ESPAÇAMENTO	88
4. CONCLUSÕES	96
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
6. MATERIAL SUPLEMENTAR	99
ARTIGO III	101
RESUMO	101
1. INTRODUÇÃO	102
2. EXPERIMENTAL	103
2.1 REAGENTES	103
2.2 INSTRUMENTOS	103
2.3 <i>SOFTWARES</i>	104
2.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE AuNP's	104
2.5 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE	105
2.6 ACOPLAMENTO DE PROTEÍNAS	105
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE AuNP's	106
3.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE COM OS LIGANTES	108
3.3 DETERMINAÇÃO DA ESPESSURA DAS MONOCAMADAS	114
3.4 DETERMINAÇÃO DA CARGA DE SUPERFÍCIE	115
3.5 ESTABILIDADE DAS AuNP's COM SUPERFÍCIE MODIFICADA ...	117
3.6 OTIMIZAÇÃO DO ACOPLAMENTO DE PROTEÍNAS	121
4. CONCLUSÕES	124
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

6. MATERIAL SUPLEMENTAR	129
ARTIGO IV	133
RESUMO	133
1. INTRODUÇÃO	134
2. EXPERIMENTAL	135
2.1 Materiais	135
2.2 Instrumentos.....	135
2.3 <i>Softwares</i>	136
2.4 Síntese e caracterização de AuNP's.....	136
2.5 Conjugação de AuNP's com Anticorpos.....	136
2.6 Determinação total de anticorpos ligados.....	137
2.7 Determinação da orientação dos anticorpos.....	137
2.8 Detecção do 17 β -estradiol por CLAE.....	138
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	138
3.1 Síntese e caracterização de AuNP's	138
3.2 Conjugação de AuNP's com Anticorpos	140
3.3 Detecção do 17 β -estradiol por LSPR	145
4. CONCLUSÕES	148
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

ESTRUTURA DA TESE

Para melhor compreensão dos resultados deste trabalho, optamos por estruturar este documento da seguinte maneira: Introdução, objetivos e revisão bibliográfica e em seguida os 4 capítulos já formatados como artigo.

Relação de artigos:

Artigo 1 - A helpful method for the control of gold nanoparticles monodispersity through response surface modelling technique;

(Status: Under Review / Arabian Journal of Chemistry)

Artigo 2 - Uso da Microscopia Eletrônica de Transmissão Convencional para o estudo do espaçamento entre partículas utilizando diferentes ligantes;

(Status: Submetido / Bioconjugate Chemistry)

Artigo 3 -. Nanopartículas de ouro com superfície modificada: efeito do comprimento do ligante na estabilidade coloidal e na interação com proteínas;

(Status: em revisão para submissão)

Artigo 4 -. Conjugação covalente de anticorpos com nanopartículas de ouro para aumento da sensibilidade na detecção do 17 β estradiol.

(Status: em revisão para submissão)

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia vem promovendo uma nova fronteira do estudo da matéria, permitindo que materiais já conhecidos tivessem suas propriedades redescobertas ao serem manipulados em um nível molecular. Devido à sua estabilidade química, propriedades ópticas e alta densidade de elétrons, as nanopartículas de ouro (AuNP's) têm sido o centro das atenções na área de nanobiotecnologia, sendo rotineiramente utilizadas como materiais de referência para o estudo de aplicações em sistemas biológicos nas últimas décadas.

As AuNP's exibem inúmeras propriedades físicas interessantes as quais possuem relação direta com a diversidade de aplicações, dentre elas, destacam-se, a ressonância plasmônica de superfície (SPR), espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS), propriedades ópticas não-lineares (NLO) e efeito de carga quantizada [1-4]. As AuNP's podem apresentar características físicas e químicas diferentes apenas alterando tamanho, auto-organização, estrutura cristalina e forma, ao ponto dos materiais em escala nanométrica exibirem propriedades distintas dos materiais na escala macroscópica [5,6]. Esta exploração tem permitido o emprego das AuNP's em diferentes campos, tais como na construção de biosensores, em sistema de liberação gradativa de drogas, lubrificantes, células solares, catálise [7-11]. Além disso, diversos trabalhos [12-16] têm dado uma notável atenção em aplicações na biotecnologia e nanomedicina.

A interface nano-bio compreende as interações dinâmicas, físico-químicas, cinéticas e termodinâmicas entre as superfícies de nanomateriais e as superfícies dos componentes biológicos (por exemplo: proteínas, membranas, fosfolípidios, organelas, DNA e fluidos biológicos). As proteínas são uma das classes mais importantes de agentes biológicos para serem combinados com nanopartículas inorgânicas para pesquisa. Sua conjugação com nanomateriais aumenta ainda mais as possibilidades destas estruturas para utilização com base em processos de reconhecimento imunitário, em que as partículas atuam, por exemplo, como veículos para a entrega inteligente de drogas específicas [17], ressonância magnética, agentes de contraste para imagiologia [18], biosensores e como marcadores para imuno-ensaios [19].

Apesar do interesse crescente em nanobioconjugados, a tecnologia atual tem se limitado por desafios na sua engenharia e pela reprodutibilidade. Assim, se quisermos ir além dos biomarcadores de detecção, para níveis de quantificações cada vez menores com informações mais detalhadas e complexas, mais esforços nessa direção precisarão ser realizados. Isto se reflete ao número limitado de métodos químicos existentes para o acoplamento e a funcionalização de componentes biológicos para vários tipos de nanopartículas (NP's).

Assim, esperamos com esse trabalho estabelecer um método confiável e reprodutível para geração de nanoconjugados para aplicações biológicas, avaliando cada etapa da construção desse sistema, tais como: a síntese de AuNP's de tamanho controlado, a influência de diferentes ligantes na modificação química da superfície, a estabilidade desses sistemas em diferentes condições de pH e força iônica e também a otimização das etapas de conjugação via acoplamento covalente com proteínas. Acreditamos que esta abordagem poderá levar a uma compreensão importante para uma ampla variedade de complexos híbridos orgânico-metálicos, sendo fundamentais para o aprimoramento e o desenvolvimento de novas aplicações em nanobiotecnologia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer métodos reprodutíveis de síntese, modificação química e bioconjugação de nanopartículas de ouro para o desenvolvimento de nanosensores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um método de síntese de nanopartículas de ouro monodispersas utilizando citrato e borohidreto de sódio como agentes de redução;
- Investigar a influência do comprimento dos ligantes tiolados na funcionalização e estabilidade em diferentes faixas de pH e força iônica;
- Desenvolver um método para a determinação da espessura de monocamadas após a modificação da superfície metálica por microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Investigar a interação eletrostática e o acoplamento covalente de proteínas na superfície das AuNP's, delineando a melhor condição experimental em função da quantidade de proteínas adsorvidas à superfície do metal;
- Determinar a orientação de anticorpos do tipo IgG na superfície metálica por métodos de conjugação eletrostática e covalente avaliando a influência na detecção do 17 β -estradiol.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 NANOMATERIAIS E NANOTECNOLOGIA

A nanociência é uma das principais áreas de progresso científico nos dias de hoje, e deverá certamente contribuir para um significativo avanço na área de biotecnologia nos próximos anos. Esse avanço proporcionou uma nova fronteira no estudo da matéria, permitindo que materiais já conhecidos tivessem suas propriedades redescobertas e investigadas detalhadamente ao serem manipuladas em um nível molecular. A biotecnologia tem sido identificada como um dos campos que podem se beneficiar muito com o avanço da nanotecnologia.

A definição de nanomateriais ainda é bastante ampla, porém a mais comumente aceita é de que são estruturas cujo tamanho está entre 1 e 100 nm e cujas características são distintas daquelas observadas pelo mesmo material quando este se encontra em escala macrométrica [20]. Materiais em nanoescala são particularmente interessantes em sistemas biológicos, uma vez que a maioria das biomoléculas e estruturas celulares possuem uma mesma faixa de tamanho, favorecendo assim a sua incorporação em um ambiente biológico. A Figura 1 apresenta um esquema detalhado mostrando a comparação do tamanho de algumas biomoléculas em relação a alguns nanomateriais.

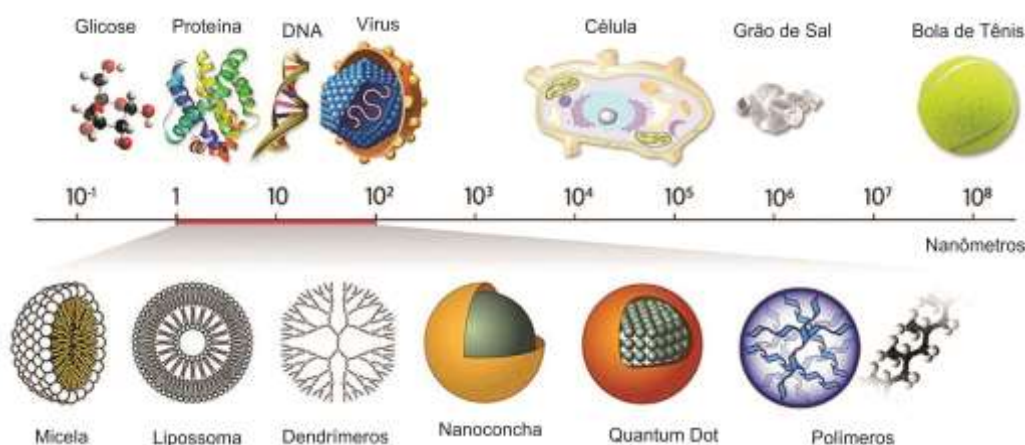


Figura 1. Esquema detalhado mostrando a relação da escala de tamanho de nanopartículas (por exemplo, lipossomas, dendrimeros, nanoshells, *quantum dots* e polímeros), em comparação com outros materiais (parte de cima). Adaptado de National Cancer Institute [21]

Atualmente existem vários tipos de nanomateriais, a maioria deles envolvem o uso de partículas metálicas, polímeros, óxidos ou a exploração de materiais carbonosos como os nanotubos de carbono, grafeno e fulereno [21]. Como o estudo destes nanomateriais é amplo, optamos por abordar detalhadamente nesta revisão apenas as nanopartículas de ouro que são objetos de estudo desta tese.

3.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO

O ouro foi descoberto na Bulgária há cinco mil anos, e o ouro coloidal deve ter aparecido pela primeira vez na antiguidade na China ou no Egito para fins terapêuticos e decorativos. Um exemplo famoso é o cálice de Licurgo, a partir do século 4 (Figura 2), visível no Museu Britânico, em Londres. Coloides de ouro têm sido recomendados para a cura de várias doenças ao longo dos séculos até os dias de hoje, embora os mecanismos de ação sejam ainda mal compreendidos [22]. Em 1857, Faraday relatou o primeiro artigo científico sobre AuNP's, atribuindo a cor vermelha à natureza coloidal do ouro [23] e em 1908 Mie racionalizou a absorção visível de AuNP's usando equações eletromagnéticas de Maxwell [24]. Esses nanomateriais estão disponíveis na faixa de 1 a mais de 100 nm e a sua banda característica de absorção no visível pode ser observada quando o coloide apresenta núcleos metálicos acima de 3 nm. As AuNP's têm demonstrado aplicações consideráveis em óptica, catálise, ciência dos materiais e nanotecnologia, incluindo biologia e nanomedicina. [25]



Figura 2. Cálice de Lycurgus do século 4 dC, aparece verde quando iluminado na parte da frente, e vermelho quando iluminado por dentro. Adaptado de [26]

3.2.1 Mecanismos de Formação de Nanopartículas de Ouro

Nos últimos 50 anos, a síntese de nanopartículas coloidais tem sido monitorada de forma intensiva, devido às enormes aplicações tecnológicas e científicas [27]. Como descrito anteriormente, os fundamentos da ciência de coloides metálicos foram estabelecidos por Michael Faraday, com seus experimentos inovadores em sóis de ouro [28]. Faraday atribuiu a cor vermelha de uma solução à presença de ouro coloidal, obtido por redução de Au^{3+} usando fósforo branco [23].

Novos progressos importantes na descrição do comportamento de NP's foram alcançados por Wilhelm Ostwald no final do século 19, em especial através da sua teoria do crescimento das partículas através da maturação de Ostwald [29]. Seu filho Wolfgang Ostwald tornou-se um dos cientistas mais influentes no campo de química coloidal no início do século 20 e é o fundador da Sociedade Alemã de Coloides. Em 1925, Richard Zsigmondy recebeu um Prêmio Nobel por seu trabalho sobre coloides e a invenção do ultramicroscópio, o que possibilitou a observação direta de partículas contidas em soluções coloidais. Desde o trabalho inovador de Faraday em 1857, numerosos métodos experimentais para a síntese de metal, óxido de metal e semicondutores de NP's têm sido desenvolvidos [25,27,28], como a redução clássica de ácido cloroáurico em solução aquosa por citrato trissódico [30].

Esse procedimento sintético tornou-se popular com o trabalho desenvolvido por John Turkevich na década de 1950, um professor de química de Princeton e um pioneiro no campo da catálise. Até hoje, os processos subjacentes de formação coloidal, como a teoria da nucleação clássica (desenvolvido por Becker e Döring na década de 1930) [31] e a teoria da nucleação instantânea descrita por LaMer e colaboradores na década de 1950 [32,33] são vistos como modelos para explicar a formação de nanopartículas metálicas. No entanto, tem sido demonstrado que a teoria da nucleação clássica e a teoria de LaMer não conseguem descrever os mecanismos que afetam o crescimento de nanopartículas [34].

Mesmo após mais de 150 anos de pesquisa na área de coloides metálicos, mecanismos de formação de NP's ainda são discutidos de forma controversa. Até o momento, nenhuma teoria ou modelo teórico foi capaz de descrever ou prever a evolução do tamanho da

partícula ou distribuição de tamanhos de forma abrangente. Além disso, apenas informações limitadas dos diferentes processos físico-químicos subjacentes, como o processo de redução ou a estabilidade dos coloides estão disponíveis [34]. Xia *et al* descreveu esta situação muito apropriadamente, afirmando que "No atual estágio de desenvolvimento, não é um exagero dizer que a síntese química de nanocristais metálicos continua a ser mais uma arte do que uma ciência" [35].

Na última década, o método de redução pelo citrato tem sido cada vez mais referido como "síntese Turkevich", em homenagem a John Turkevich que descreveu a reação em 1951. Até hoje, o protocolo de síntese original foi modificado várias vezes, permitindo a fabricação de NP's em uma ampla gama de tamanhos [36-40]. A Figura 3 mostra o esquema detalhado da síntese de AuNP's pelo método de Turchevich.

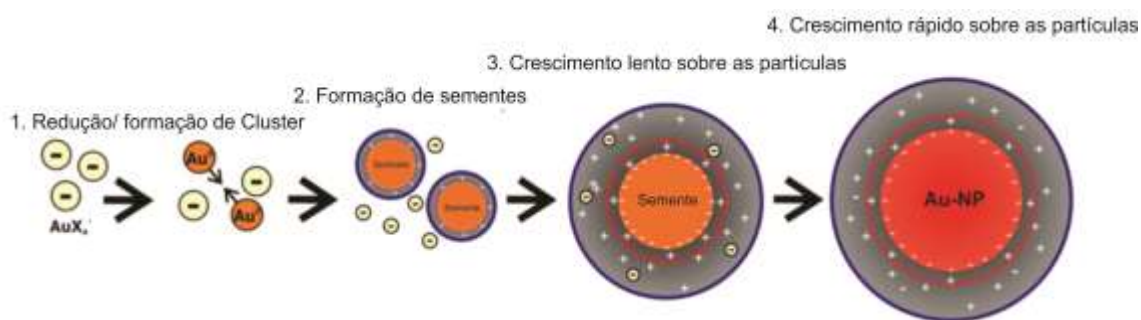


Figura 3. Mecanismo geral de crescimento da síntese Turkevich deduzido por Polte [27]. Neste método, o precursor de ouro é reduzido pela reação de redução com o citrato de sódio, podendo crescer pela condensação de átomos de ouro sobre as suas superfícies e também pela coagulação com outras partículas.

Logo após o desenvolvimento do modelo proposto por Turkevich de crescimento de nucleação difusa, Kumar e colaboradores [41] desenvolveram um modelo quantitativo com base neste mecanismo de crescimento. Gerorgiev e colaboradores [42] sugeriram um mecanismo de crescimento Finke-Watzky que consistia em um processo de nucleação contínua e de crescimento rápido. Recentemente em 2010, Ojea-Jimenez e colaboradores [43] descreveram um mecanismo molecular para redução de Au^{3+} pelo citrato e em 2012 [44] este mesmo grupo propôs uma modelagem do mecanismo de redução sob diferentes condições de pH utilizando cálculos DFT (*Density Functional Theory*) contribuindo para uma melhor compreensão do processo de redução. No entanto, os resultados permaneceram não relacionados com o mecanismo de crescimento das partículas dependente do fornecimento de monômeros no processo de redução. Polte e seu grupo de

pesquisa têm publicado ao longo dos últimos 6 anos [45-52] estudos dos mecanismos de síntese de nanopartículas de ouro, e tem afirmado que ainda estamos longe de compreender as influências dos parâmetros de síntese sobre o processo de crescimento e sobre o tamanho final das nanopartículas.

Em geral, a razão pelo qual o mecanismo de crescimento de soluções coloidais serem mal compreendidos é atribuído ao fato de que os dados apropriados sobre a evolução do tamanho durante a formação das partículas é de difícil obtenção [53]. No caso do método Turkevich, um número surpreendentemente grande de contribuições abordam o processo de crescimento das partículas ou o mecanismo de redução química, o que enfatiza a importância geral deste procedimento sintético.

A forma e o tamanho de AuNP's dependem de diversas variáveis de processo, tais como concentrações dos reagentes, temperatura, pH, surfactantes, aditivos, entre outros. Vários autores já discutiram os efeitos dessas variáveis sobre a cinética de formação, tamanho e morfologia de AuNP's [54-57]. É conhecido que a nucleação e as fases iniciais de cristalização a partir de soluções aquosas promovem influência determinante na morfologia e nas propriedades das nanopartículas metálicas, porém, a compreensão da síntese com relação aos mecanismos e a cinética continuam a ser um desafio [58]. Em princípio, é possível ajustar as suas propriedades de forma desejada, controlando um dos parâmetros acima referidos, que exige, essencialmente, a compreensão dos processos de formação.

A tabela apresentada na Figura 4 destaca os progressos na síntese de nanopartículas metálicas, e reflete a diversidade de forma e dimensões que podem ser obtidas. Esta figura foi batizada de “Tabela Periódica” das nanopartículas plasmônicas por Shawn *et al* [59], devido as diferentes propriedades apresentadas em função das dimensões.

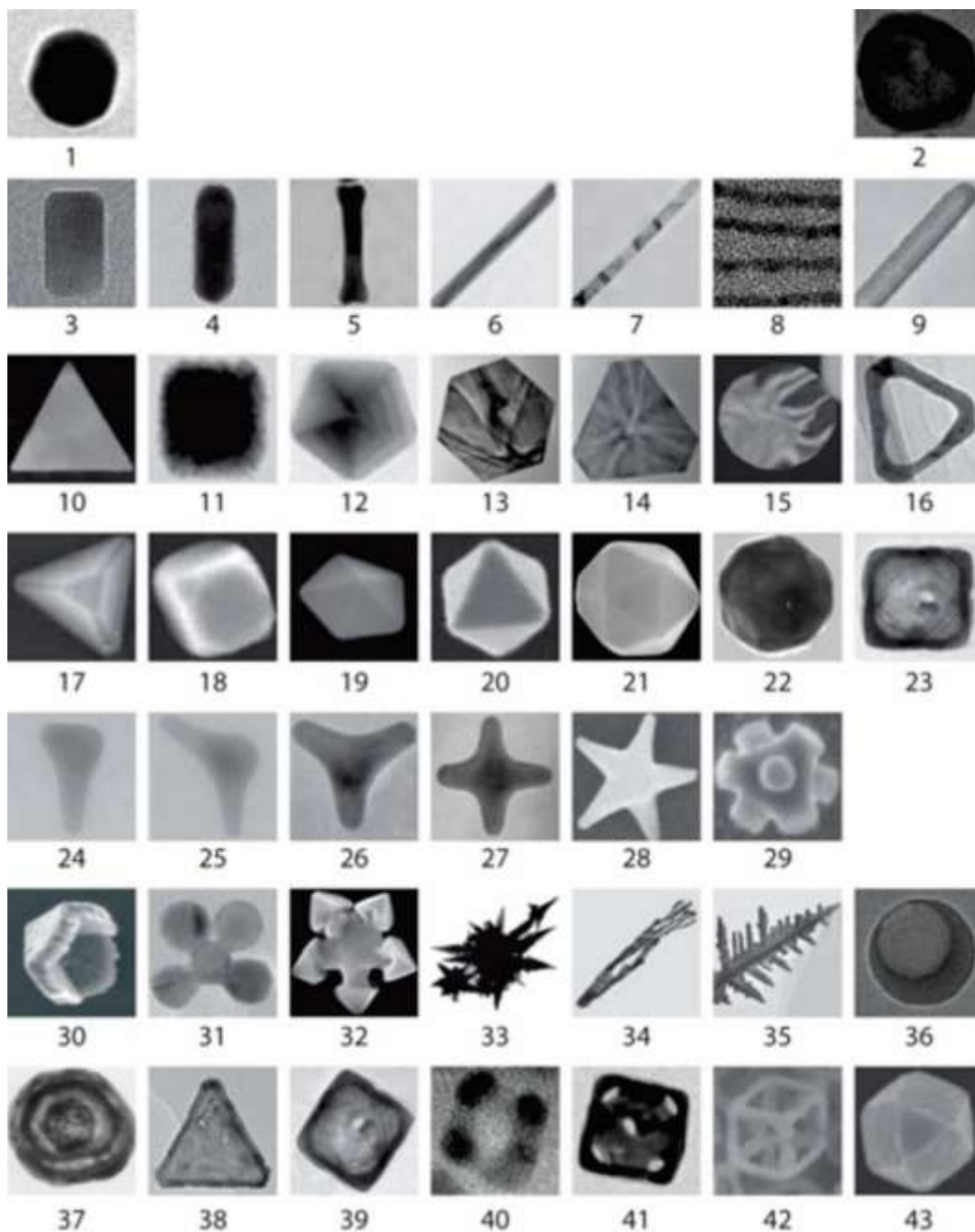


Figura 4. Tabela de classificação de nanopartículas plasmônicas. A classificação foi feita com base em parâmetros geométricos. Cada linha representa um nível diferente de dimensionalidade e complexidade, tais como esféricas (1,2), semelhante a haste (3 a 9), poligonais (10 a 16), poliédricas (17 a 23), ramificadas (24 a 29), estruturas mais complexas (30 a 36) e estruturas ocas (37 a 43). Em cada linha, a ordem geométrica das estruturas (em termos de relação de aspecto, número de lados e facetas, ou número de ramos) aumenta a partir da esquerda para a direita. Adaptado de [59]

3.3 PROPRIEDADES DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanopartículas coloidais exibem propriedades elétricas, ópticas, magnéticas e químicas diferentes dos seus homólogos em massa. Estas propriedades são determinadas por parâmetros como o tamanho, forma, composição e estrutura cristalina. Suas propriedades únicas qualificam para uma ampla gama de aplicações em campos como a medicina, biotecnologia e catálise, colocando NP's coloidais entre os materiais em nanoescala mais intensamente estudados. A Figura 5 ilustra diferentes respostas ópticas que ocorrem quando a luz é absorvida e dispersa por uma nanopartículas metálica.

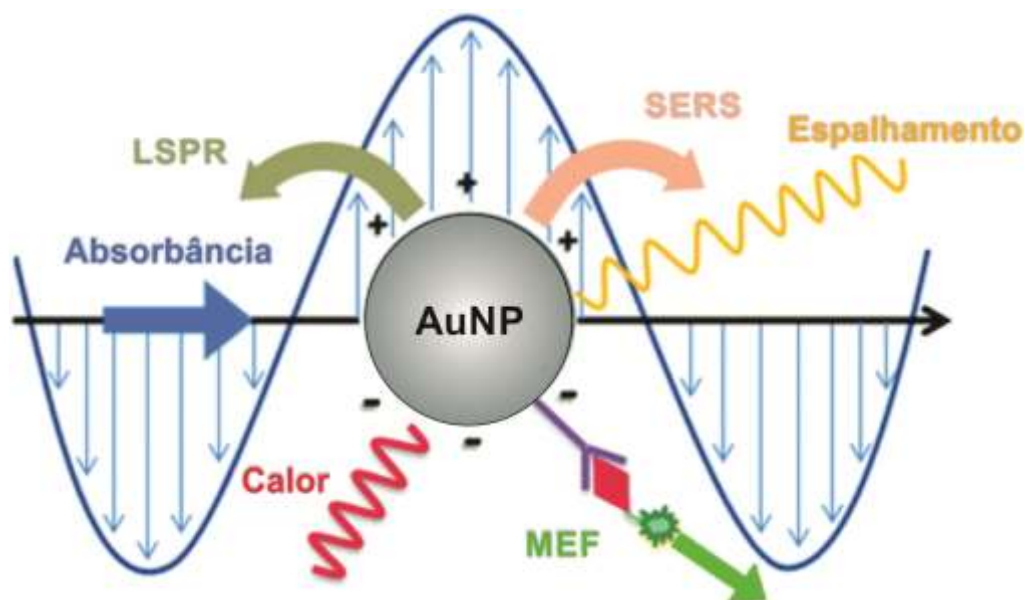


Figura 5. Representação esquemática das oscilações de carga de superfície induzidas causadas por um campo de luz externa e possíveis respostas espectroscópicas para a detecção de biomoléculas sensíveis. A luz interage com a nanopartícula levando a absorção e dispersão da radiação incidente. LSPR – Ressonância plasmônica de superfície localizada; SERS – Espalhamento Ramam intensificado por superfície; MEF – Fluorescência intensificada pelo metal. Adaptado de [60].

As dispersões coloidais compostas por nanopartículas metálicas diferenciam-se completamente das demais em virtude de uma propriedade óptica que elas apresentam, denominada de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). Essa propriedade dá cor aos coloides formados e possui intensa absorção e espalhamento da luz na região visível do espectro eletromagnético, destinando-os a finalidades específicas desses tipos de sistemas. As propriedades ópticas de nanopartículas metálicas surgem da interação da luz com nanoestruturas de dimensões menores que o seu comprimento de onda. Nessa condição,

considera-se que a partícula está sob influência de um campo eletromagnético quase estático e homogêneo. Tal interação gera uma separação de cargas na superfície metálica, que apresenta uma forte força restauradora, originando um dipolo oscilante. Dessa forma, são induzidas oscilações coerentes dos elétrons da banda de condução da nanoestrutura em ressonância com a radiação incidente, dando origem a um campo eletromagnético intensificado na superfície da nanoestrutura. A excitação não propagante dos elétrons de condução é conhecida como ressonância plasmônica localizada de superfície (LSPR – Localized Surface Plasmons Resonance). A Figura 6 apresenta um esquema mostrando a LSPR,

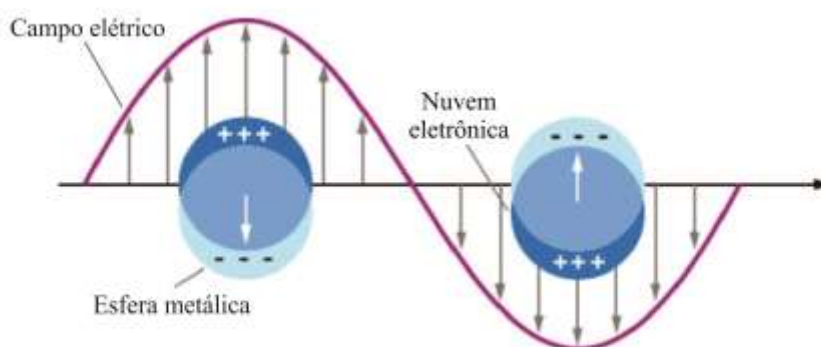


Figura 6. Esquema mostrando a ressonância plasmônica de superfície localizada em nanopartículas metálicas.

Como resultado destes modos LSPR, as NP's podem absorver e dispersar a luz de forma tão intensa que as nanopartículas individuais são facilmente observadas usando microscopia de campo escuro (dispersão óptica) [61,62]. Este fenômeno permite que tais materiais sirvam de rótulos e sondas extremamente intensas para imunossaios [63,64], sensores bioquímicos [65-70] e espectroscopia melhorada de superfície [71-72].

Em relação ao tamanho, nanopartículas menores são vantajosas na marcação de proteínas e imageamento celular porque a sua menor área de superfície reduz interações não específicas e permite um melhor direcionamento [73]. Além disso, as partículas menores produzem mais campos eletromagnéticos confinados de modo que eles são mais sensíveis às moléculas individuais, que ocupam uma parte maior da sua região sensora. No entanto,

a absorção e o espalhamento dependem fortemente do tamanho das nanopartículas, aumentando com o volume de nanopartículas para a absorção e com o quadrado do volume para dispersão [73].

Marzan e colaboradores [74] observaram que NP's abaixo de 3 nm de diâmetro não podem ser consideradas como nanopartículas plasmônicas por não apresentarem uma banda de condução definida. Nesse caso, essas partículas são referidas como clusters e representados pelos orbitais moleculares. Para NP's acima deste tamanho, um campo eletromagnético intensificado aparece na superfície permitindo propriedades ópticas amplamente utilizadas nas técnicas espectroscópicas. Os coeficientes de extinção das bandas de LSPR por exemplo, são extremamente elevados, até $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que são várias ordens de grandeza maiores do que todos os corantes orgânicos [75]. AuNP's com um diâmetro menor do que 20 nm, mostram essencialmente absorção, mas com o aumento do tamanho, há também aumento na razão de dispersão para a absorção. A alta dispersão é de fato necessário para imagiologia biológica baseada em espalhamento de luz.

O coeficiente de extinção das nanopartículas metálicas depende da sua composição, tamanho, forma, orientação e do ambiente dielétrico [76]. A Figura 7 mostra os espectros de extinção para uma série de nanopartículas de prata como exemplo, com comprimento de onda variando entre 426 e 782 nm. Nota-se os deslocamentos para o vermelho com a variação das dimensões (tamanho e forma).

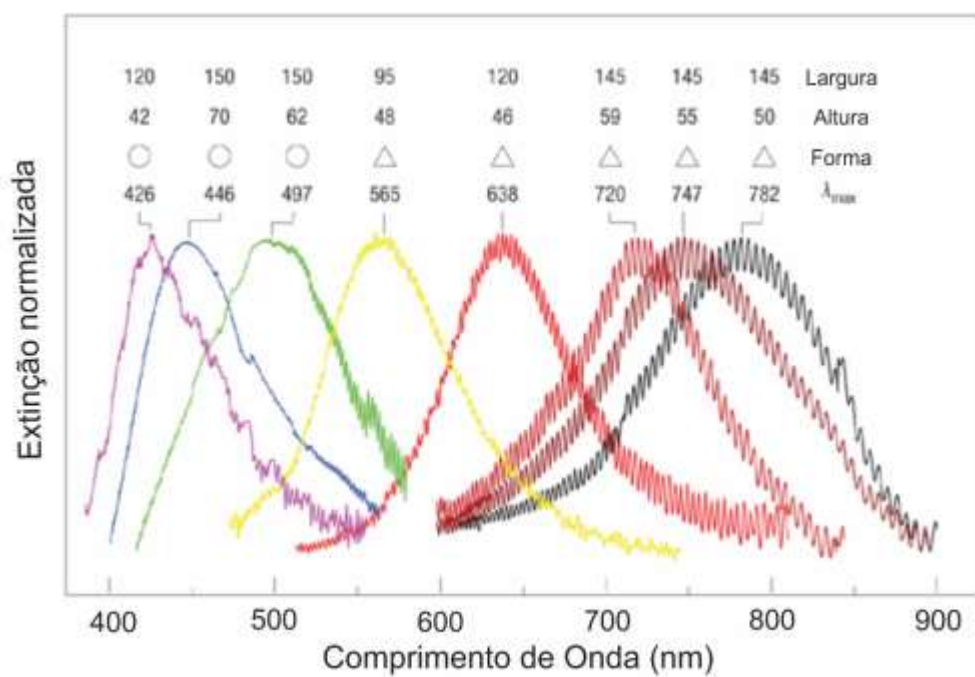


Figura 7. Exemplo do deslocamento dos espectros de nanopartículas metálicas de prata em função das dimensões. Adaptado de [77]

3.4 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS AuNP's

A fim de melhorar a estabilidade das nanopartículas, as moléculas adsorvidas à superfície podem ser trocadas por outras que, possivelmente, podem proporcionar novas propriedades ou funções para as partículas. O material orgânico pode atuar como uma barreira física ou contra a agregação eletrostática, diminuindo a reatividade dos átomos da superfície, ou atuando como uma película eletricamente isolante [78]. Na maioria dos casos, a molécula do ligante de entrada liga-se mais fortemente na superfície das NP's inorgânicas [79], muito provavelmente por haver uma diminuição na energia livre da interface entre o metal e o ambiente com este tipo de ligação [80].

Um exemplo comum são as AuNP's sintetizadas por redução química com citrato em uma solução aquosa. As nanopartículas resultantes foram carregadas negativamente pelos íons citrato adsorvidos na sua superfície e, assim, são estabilizadas por repulsão eletrostática. Embora tais coloides possam ser estáveis durante anos na solução, eles agregam irreversivelmente quando concentrados ou na presença de baixas quantidades de sais. A camada de citrato pode ser substituída por moléculas ligadas covalentemente à superfície da partícula; exemplos populares incluem fosfinas sulfonadas, alcanotóis e ácidos mercaptocarboxílicos, tais como o ácido mercaptoacético (MAA), ácido mercaptopropiónico (MPA) e ácido mercaptoundecanóico (MUA) comumente utilizados em ensaios de acoplamento covalente com biomoléculas [81].

Esses conjuntos orgânicos formados pela adsorção de constituintes moleculares na superfície metálica são conhecidos como monocamadas auto-organizadas, sendo referidos comumente na literatura como SAM's (Self Assembly Monolayers). A espessura de um SAM é tipicamente 1-3 nm, embora camadas mais espessas (10-100 nm) possam ser produzidas sobre filmes finos por técnicas recentes, como sondas de varredura, feixes de fótons, elétrons ou átomos. SAM's proporcionam um sistema conveniente, flexível e simples, alterando as propriedades interfaciais de metais, óxidos metálicos e semicondutores. As moléculas ou ligantes que formam essas monocamadas tem uma funcionalidade química, ou "*headgroup*", com uma afinidade específica para um substrato. Em muitos casos, o *headgroup* também tem uma afinidade elevada para a

superfície e desloca materiais orgânicos adsorvidos a partir da superfície. A Figura 8 apresenta um esquema simplificado mostrando a formação de SAM's.

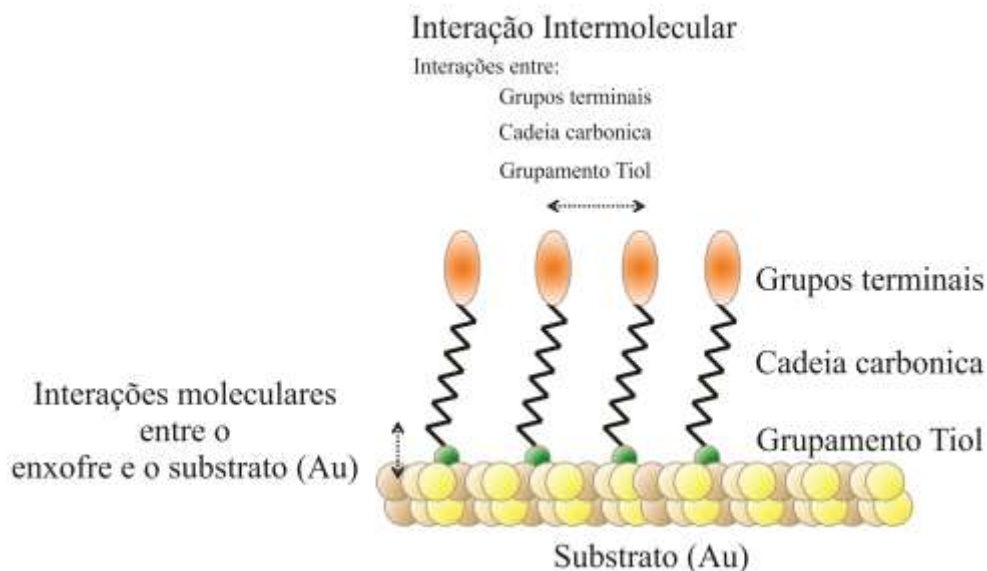


Figura 8. Esquema simplificado mostrando a formação de monocamadas auto-organizadas. Moléculas de tiol organizam uma estrutura estável em superfícies de ouro devido a forte afinidade entre *headgroups* de enxofre e o ouro [82]

Entre as abordagens sobre modificação química de nanopartículas metálicas, as SAM's expandiram as possibilidades de superfícies orgânicas para estudos fundamentais, especialmente no campo da nanociência. A elevada afinidade de tióis para as superfícies de metais nobres tornou possível gerar superfícies orgânicas bem definidas com funcionalidades químicas úteis e altamente alteráveis exibidos na interface exposta [83,84]. A Figura 9 apresenta as características de cada constituinte na modificação da superfície química de nanopartículas de ouro por um alcanotiol.

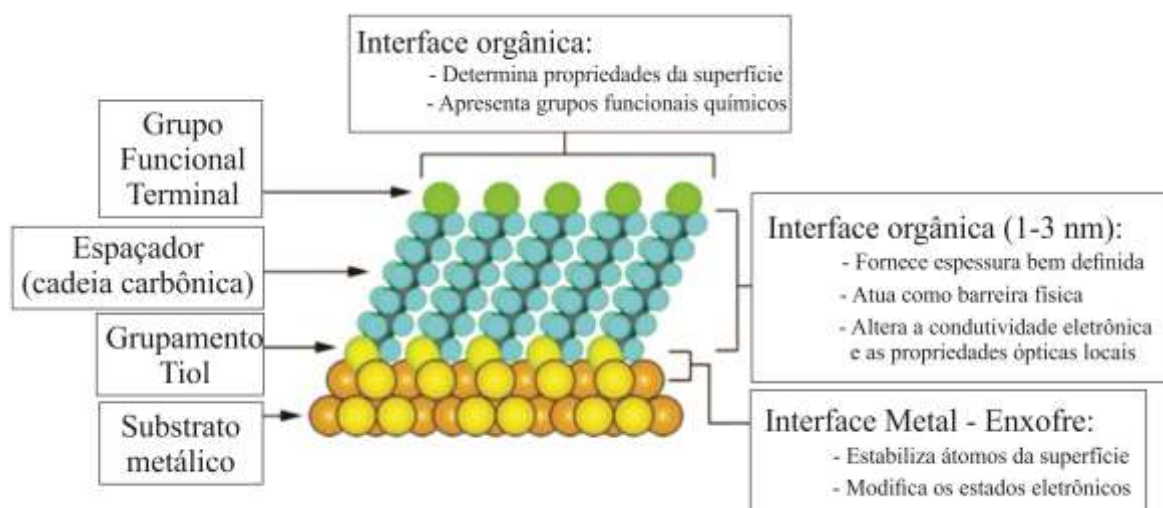


Figura 9. Diagrama esquemático mostrando SAM's de alcanotióis sobre a superfície cristalina de ouro. As características estão realçadas. Adaptado de [78].

O grupo tiol é considerado por mostrar elevada afinidade para superfícies de metais nobres, em particular o ouro (cerca de 200 kJ mol^{-1}) [85]. Essa ligação é frequentemente denominada 'quimiossorção', embora também conhecida como ligação covalente [79]. O mecanismo exato e a natureza dessa interação ainda estão sujeitos a investigações e discussões [86-90].

A superfície metálica de uma nanopartícula consiste não só de diferentes facetas cristalinas, mas também uma grande parte de arestas, falhas e vértices [91], resultando em sítios com diferentes afinidades para ligação de moléculas, dificultando assim a caracterização das monocamadas [85]. Além disso, a molécula ligada parece ser móvel sobre a superfície, ou seja, capaz de se difundir em um certo grau, na superfície da partícula depois de ter ligada [91]. Na fase aquosa, a substituição de moléculas de ligantes pode ser facilitada por detergentes adicionais [92]. Estratégias tem sido relatadas para tornar o sistema mais estável em relação a possível agregação em concentrações elevadas de sais e pH ácido [93,94] e a utilização de ligantes com dois grupamentos tióis já foi descrita [95].

A troca de ligantes também foi demonstrada com dendrímeros [96,97], peptídeos [98-100], e também com proteínas, substituindo mercaptocarboxílicos da superfície metálica [101]. Estas considerações implicam que, para a troca de ligantes, as novas moléculas devem ter uma afinidade tão forte quanto possível para o núcleo inorgânico, a fim de substituir de

forma rápida e eficaz as moléculas já ligadas na superfície metálica. Além disso, a geometria molecular dos ligantes em relação ao diâmetro das partículas é um fator que influencia a densidade das moléculas adsorvidas, o que por sua vez influencia, em última instância a estabilidade coloidal das partículas. A Figura 10 apresenta exemplos das principais moléculas de ligantes tiolados com diferentes estruturas, esquematizadas numa escala real.

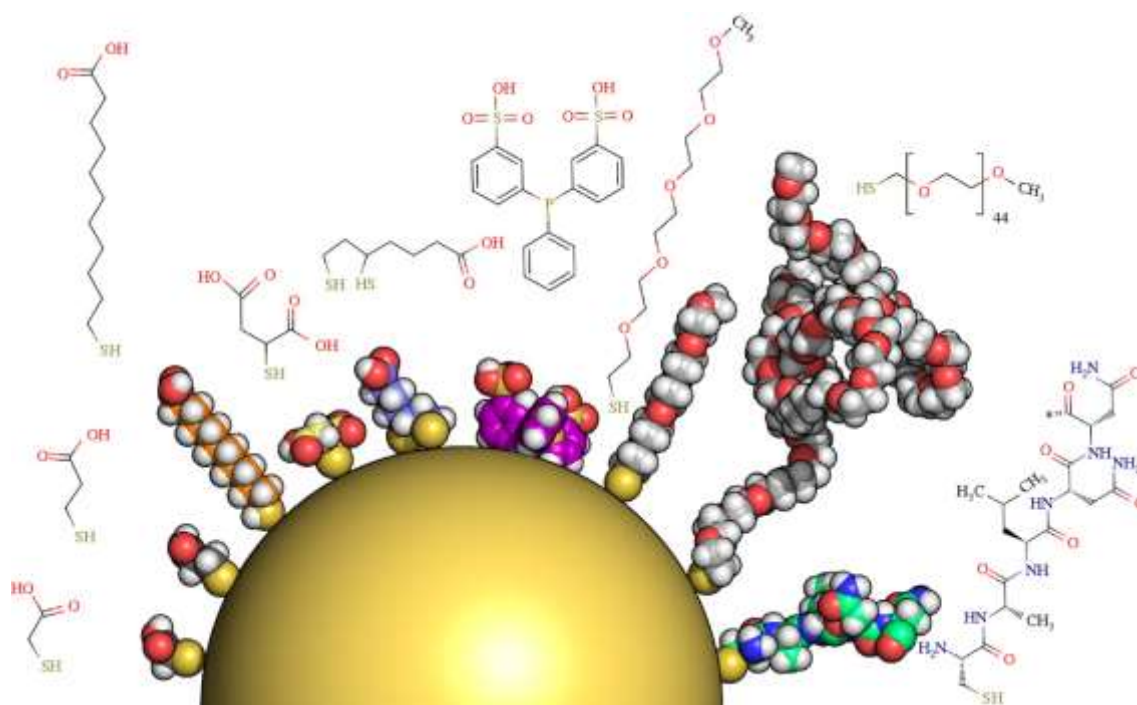


Figura 10. Nanopartícula de ouro com 5 nm de diâmetro com diferentes moléculas de ligantes desenhadas em escala real. A partícula é idealizada como uma esfera lisa. Da esquerda para a direita: ácido mercaptoacético (MAA), ácido mercaptopropiônico (MPA), ácido mercaptoundecanoico (MUA), ácido mercaptosuccínico (MSA), ácido dihidrolipídico (DHLA), trifenílfosfina bi-sulfonada, metil-polietilenoglicol-tiol (mPEG₅SH), mPEG₄₅SH (2000 g.mol⁻¹) e um curto peptídeo da sequência CALNN. Adaptado de [79]

O protocolo mais comum para a preparação de SAM's em ouro é adição de uma solução etanólica de tióis (~1-10 mM) no coloide de ouro por ~12-18 h à temperatura ambiente (25°C). Este protocolo foi descrito por Bain e colaboradores em 1989 [83] e tem sido utilizado até os dias de hoje por apresentar grande reprodutibilidade. Estes autores afirmaram que a cobertura densa de adsorvatos é obtida rapidamente (milésimos de segundo a minutos), mas o processo de recuperação é lento e requer tempos na ordem de horas para maximizar a densidade de moléculas e minimizar os defeitos na formação das monocamadas.

Alguns fatores experimentais podem afetar a estrutura das monocamadas e a sua taxa de formação, tais como, tipo de solvente, temperatura, concentração de ligantes, tempo de imersão entre outros. No entanto, os efeitos do comprimento da cadeia e da estrutura do ligante sobre as propriedades de SAM's são ainda pouco conhecidos.

Para aplicações em meio biológico, há ainda um relativo desafio relacionado a estabilidade desses sistemas. Havendo necessidade de estabelecer condições experimentais ótimas para a modificação química de NP's a fim de produzir interfaces orgânicas com comportamentos funcionais reproduzíveis para aplicações em sistemas biológicos.

3.5 CONJUGAÇÃO DE AuNP's COM PROTEÍNAS

Proteínas são uma das classes mais importantes de agentes biológicos para serem combinadas com nanopartículas inorgânicas para pesquisa. Sua conjugação com nanomateriais aumenta ainda mais as possibilidades destas estruturas para utilização em aplicações com base em processos de reconhecimento imunitário, em que as partículas atuam, por exemplo, como veículos para a entrega inteligente de drogas específicas [102], ressonância magnética, agentes de contraste para imagiologia [103], e como marcadores para imuno-ensaios [104]. Portanto, não é surpreendente que a sua utilização extensiva permita a sua aplicação como modelo para o estudo desta interface.

A conjugação de nanopartículas inorgânicas com biomoléculas gera materiais híbridos que permitem a interação de nanopartículas metálicas com sistemas biológicos. As características estruturais únicas das proteínas fornecem uma série de opções para a modificação e conjugação. Atualmente, as estratégias utilizadas para funcionalização são de 4 tipos:

- i) adsorção (eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals);
- ii) quimissorção (por exemplo, através de grupos de tiol);
- iii) acoplamento covalente, explorando os grupos funcionais em ambas as partículas e biomoléculas;
- iv) não-covalente, baseados na afinidade de sistemas receptor-ligante.

Entre estes, a adsorção física é o método mais fácil e mais utilizado, porém sofre frequentemente orientação aleatória e desnaturação de proteínas ligadas, dando origem a uma fraca reprodutibilidade [105]. A imobilização mais estável de proteínas com melhor reprodutibilidade é obtida por ligação covalente [106]. A Figura 11 ilustra o tamanho relativo de biomoléculas em relação a uma nanopartículas de ouro de 5 nm funcionalizada com PEG-tiol.

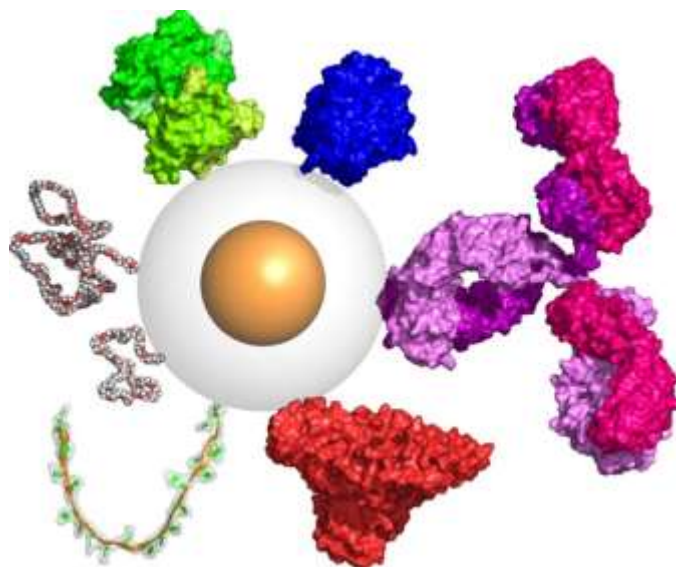


Figura 11. Representação esquemática de uma nanopartícula com 5 nm diâmetro de núcleo e 10 nm de diâmetro com a camada orgânica (PEG 5000 g mol⁻¹). As biomoléculas representadas são: estrepavidina (verde), transferrina (azul), anticorpos (IgG, roxo), albumina (vermelho), DNA de cadeia simples e outras biomoléculas para compor o espaço. As estruturas cristalinas foram obtidas em escala a partir do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Adaptado de [79].

Em relação ao acoplamento covalente, a estratégia amplamente utilizada envolve a modificação química da superfície metálica, onde os ligantes são modificados para interagirem covalentemente com as aminas ou ácidos carboxílicos residuais das proteínas. Alternativamente, os grupos funcionais presentes na superfície das nanopartículas podem ser convertidos em outros grupos funcionais por moléculas bifuncionais.

A maioria dos ligantes químicos utilizados estabilizam as nanopartículas por grupos carboxílicos carregados negativamente. Estes podem ser convertidos por exemplo, a grupos hidroxila [107] ou aminas terciárias [108]. As aminas primárias são geralmente introduzidas pela troca com grupos funcionais, pelo uso de ligantes ou adsorção de polieletrólitos [109-114]. Nos valores de pH abaixo do pKa das aminas, as partículas são carregadas positivamente e podem ser propensas a agregação durante os passos de modificação.

Os grupos carboxílicos comumente disponíveis podem reagir com aminas primárias por meio de uma reação de condensação para produzir ligações amídicas. Para isso, uma carbodiimida solúvel em água é normalmente utilizada. Depois de formar um composto intermediário com o grupo carboxílico, o grupo ativado é reativo com aminas primárias. No caso de aminas primárias presentes na superfície da partícula, o éster ativo (N-hidroxi-

succinimida; NHS) pode ser utilizado igualmente para formar ligações amídicas. Um exemplo é succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC) contendo um grupo NHS que reage com aminas primárias, convertendo-os em maleimidas que são reativos para tióis [115], como esboçado na Figura 12. Há várias outras moléculas disponíveis, o Sulfo-NHS por exemplo também é muito utilizado por melhorar a solubilidade em água.

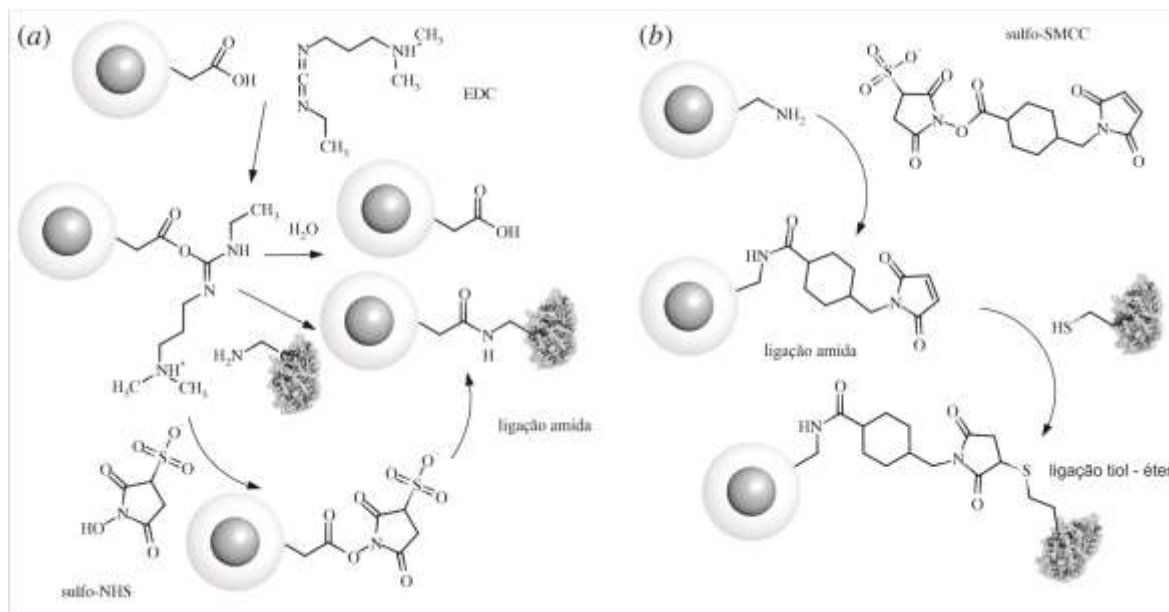


Figura 12. Em (a) reação de conjugação comum para nanopartículas funcionalizadas com ácido carboxílico. A carbodimida (EDC) forma um intermediário instável, chamado grupo carboxílico "ativado", podendo hidrolisar ou reagir com um grupo amina primário, sob formação de uma ligação amídica estável. Opcionalmente, pode reagir com NHS ou sulfo-NHS. O éster ativo tem uma semi-vida prolongada e também reage com aminas primárias. Em (b) nanopartículas com grupos amina primários com compostos de ésteres ativos para formar ligações amida. Sulfo-SMCC é um reticulador heterobifuncional com um grupo sulfo-NHS e uma função de maleimida na outra extremidade que é reativo com os grupos tiol. Adaptado de [79]

Além dessa abordagem, sistemas baseados em afinidade encontrados na natureza têm atraído cada vez mais atenção durante os últimos anos. Talvez o exemplo mais bem conhecido nas últimas décadas é o sistema avidina-biotina [116-119]. Com base no reconhecimento molecular, o sistema consiste de um ligante (a biotina -vitamina H), e um receptor, a avidina (proteína presente na clara do ovo). A avidina é uma proteína globular constituída por quatro subunidades idênticas, dando origem a quatro sítios de ligação que reconhecem e se ligam especificamente a biotina. A constante de dissociação é da ordem de 10^{15} M e a ligação, embora não covalente, é altamente estável, resistindo a condições químicas severas e temperaturas elevadas.

A forte ligação e a especificidade do sistema biotina-avidina têm permitido o emprego em um grande número de aplicações em bionanotecnologia. Atualmente, uma grande variedade de reagentes de biotinação e biomoléculas tais como oligómeros de DNA, peptídeos, anticorpos e corantes fluorescentes modificados com biotina ou avidina são comercialmente disponíveis [79].


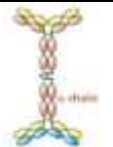
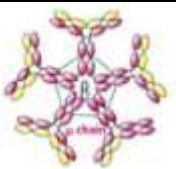


Embora amplamente utilizados, esse sistema de ligação por afinidade envolve biomoléculas grandes e normalmente não podem ser utilizadas com eficácia em aplicações que requerem a proximidade da biomolécula com a superfície metálica, como por exemplo as técnicas de LSPR e SERS. Foi demonstrado também por alguns pesquisadores [119,120] que as nanopartículas modificadas com um maior número de moléculas de biotina podem formar grandes agregados com estreptavidina por reticulação interpartícula, devido à multivalência de ambas (NP's e proteína). Este efeito não é encontrado apenas em nanopartículas com biotina-avidina, mas apresenta um problema geral no caso de ligações envolvendo compostos multivalentes. Como por exemplo, na conjugação covalente, onde muitas vezes as NP's e as proteínas alvo têm um número maior de grupos funcionais reativos (ex: ácidos carboxílicos e aminas).

3.5.1 Conjugação de AuNP's com anticorpos

Os anticorpos (Ac), também referidos como imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas encontradas no plasma e fluidos extracelulares que compreendem um dos principais efetores do sistema imunológico. Eles são responsáveis por identificar e neutralizar uma parte única de um determinado alvo externo, chamado de antígeno. Eles são produzidos no corpo por um tipo especial de células brancas do sangue chamadas linfócitos B ou simplesmente células B. Quando uma substância estranha (antígeno) entra no corpo, as células B sofrem um rearranjo nos seus genes para produzir moléculas de Ac que são capazes de interagir com o antígeno de uma forma altamente específica [121].

Em mamíferos, existem cinco classes de Ac diferentes ou isotipos com composição química diferentes (Tabela 1): IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. A classe determina o tipo e a natureza temporal da resposta imune. Além disso, os isotipos IgA e IgG apresentam diferentes subclasses (IgA1 e IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), cada uma com funções diferentes. Todas as Igs dentro de uma classe compartilham cerca de 90% de homologia, mas apenas 60% entre as classes [121].

Tabela 1. Características das classes de Ig. Adaptado de The McGraw-Hill Companies, [122,123]

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
					
Forma	Monomérica	Dimérica, Monomérica	Pentamérica	Monomérica	Monomérica
Nº e sítios de ligação	2	4,2	10	2	2
Peso Molecular (KDa)	150	160	950	180	190
Carboidratos (%)	3	7,5	12	12	12
Nº Oligossacarídeos por Região Constante	1	5	-	3	6
Total no soro (%)	80	13	6	1	0,002
Meia-vida no soro (dias)	23	6	5	3	2,5
Função Biológica	Imunidade a longo prazo; Anticorpo de Memória ; Neutraliza toxinas; Opsonização	Anticorpo secretado na membrana das mucosas	Produzir primeira resposta ao antígeno, Receptor de Célula B.	Receptor de Células B	Anticorpo de alergia e infecções

As imunoglobulinas da classe IgG são as mais abundantes do soro sanguíneo e as mais utilizadas para técnicas de biofuncionalização de nanopartículas. A estrutura básica do IgG pode ser visualizada na Figura 13, a qual compreende duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas, as quais pesam cerca de 150 kDa e apresentam um tamanho médio de $14,5 \times 8,5 \times 4 \text{ nm}^3$. A cadeia leve contém um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL), enquanto a cadeia pesada apresenta uma porção variável (VH) e três porções constantes (VL-VH). As quatro cadeias de proteínas estão ligadas entre si formando uma estrutura em “Y”. Os IgGs contêm duas regiões de ligação ao antígeno localizadas na porção final das duas estruturas amino-terminais, as quais são os “braços” do “Y”, cujo nome é fragmento Fab (Fragmento de Ligação ao Antígeno). A terceira estrutura apresenta uma porção carbóxiterminal, denominada de fragmento Fc ou porção Fc (fragmento cristalizável), a qual é responsável por gerar a resposta imune apropriada [124,125]

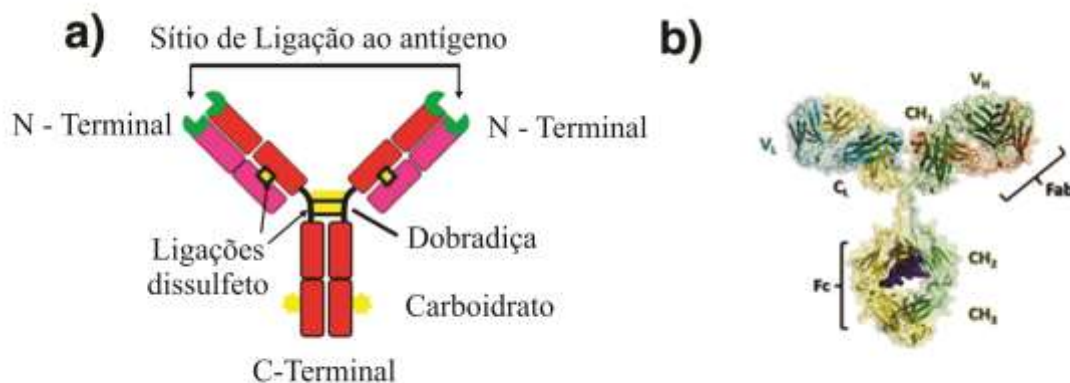


Figura 13 - Esquema de uma imunoglobulina, as duas cadeias leves em rosa e as duas cadeias pesadas em vermelho (a); Modelo tridimensional de um Anticorpo obtida a partir de cristalografia de raios - X (b); Adaptado [125]

Os anticorpos produzidos podem dividir-se em monoclonais e policlonais. Os anticorpos monoclonais possuem especificidade por um único epítipo enquanto os policlonais são capazes de se ligarem a múltiplos epítipos [126,127]. Os epítipos consistem na menor porção de um antígeno com potencial de gerar uma resposta imune, isto é, consiste na porção do antígeno que interage com a porção específica do anticorpo. Nos imunoenaios, a interação entre essas porções é altamente específica para um alvo particular e esta reação

imunoquímica pode ser convertida em fenômeno mensurável pelo transdutor, como um sinal óptico ou eletrônico [127,128].

As estratégias atualmente utilizadas para a conjugação de anticorpos na superfície metálica esbarram na falta de especificidade química, orientação na superfície ou no controle sobre o número de Ac ligados à superfície [125]. Estes são parâmetros importantes que definem o desempenho do Ac e a funcionalidade do bioconjugado. Como os anticorpos são moléculas assimétricas, eles podem adotar quatro possíveis orientações espaciais para conjugação com a superfície metálica (Figura 14) [129,130] e a orientação real pode ser uma combinação de todas elas. No caso das orientações 'cabeça' e 'lateral' a eficiência de reconhecimento de antígeno são dificultadas devido ao impedimento estérico. Portanto, uma boa opção para a bioconjugação orientada é através do fragmento Fc. Várias estratégias de conjugação garante a ligação orientada de um Ac através de uma orientação com as porções Fab livres [131-139]. Contudo, é necessário salientar que, recentemente foram demonstradas orientações "plano" que não alteram a atividade de ligação ao antígeno [140-142].

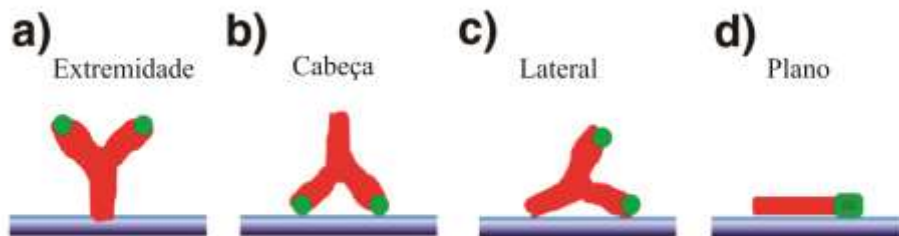


Figura 14 - Representação esquemática das quatro diferentes orientações dos anticorpos nas superfícies metálicas. Orientação "Extremidade" (Fc ligado ao substrato) (a) e orientação "Plano" (todos os três fragmentos ligados ao substrato) (d); A orientação dos anticorpos permite manter a sua funcionalidade. Contudo, esta reatividade é comprometida com o orientação "cabeça" (Fabs ligado ao substrato) (b) e orientação "lado" (um Fc e um Fab ligado ao substrato) (c); Adaptado [125]

3.6 APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA

As aplicações biotecnológicas de nanopartículas de ouro começaram na década de 1970 com o uso de nanobioconjugados após a descoberta do imunogold desenvolvido por Faulk e Taylor [143] propiciando a visualização de compartimentos celulares, proteínas e receptores (ver Figura 15). Outra aplicação bem conhecida de Au NPs é a sua utilização como sondas de biomarcadores no teste de gravidez, sendo o primeiro teste comercializado na década de 1990 (First Response®). Este teste baseia-se no reconhecimento específico do hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG), por AuNP's conjugadas com anticorpos anti-hCG. Quando uma gota de urina é adicionada à tira de teste, o bioconjugado se liga a hCG, e o complexo (hCG-AuNP's) move cromatograficamente ao longo da membrana. Em seguida, um anticorpo anti-hCG imobilizado sobre a membrana de captura permite a concentração dos nanobioconjugados e a sua identificação com a linha vermelha.



Figura 15. Esquema mostrando o procedimento da biomarcação de tecido com imunogold para visualização da lisozima humana por microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de [144].

Nas últimas décadas, muitas foram as aplicações de nanopartículas metálicas em sistemas biológicos, principalmente relacionados a técnicas de identificação e localização de moléculas por imagem, sendo cruciais numa infinidade de diagnósticos, devido a sua superioridade frente a marcadores químicos clássicos. As aplicações mais comumente relatadas são: etiquetas biológicas fluorescentes [145-147], carreamento de drogas [148,149], detecção de patógenos [150], detecção de proteínas [151], sondagem da estrutura do DNA[152], engenharia de tecidos [153,154], destruição de tumores por meio

de aquecimento (hipertermia) [155], separação e purificação de moléculas biológicas e células [156] e contraste para técnicas de RMN [157].

Além disso, nanopartículas de ouro tem recebido uma atenção especial devido às suas propriedades de ressonância plasmônica de superfície, o que pode gerar um campo eletromagnético forte com a irradiação da luz na superfície da partícula, conforme descrito anteriormente nesta revisão. Este campo induzido pela luz pode aumentar a intensidade do espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS - Surface-enhanced Raman scattering) que promove um enorme aumento do sinal do espalhamento Raman em *cerca de* 10^{14} - 10^{15} vezes. Esse efeito permite atingir o limite de detecção para o nível de uma única molécula apenas, permitindo o desenvolvimento de sondas ópticas para a detecção de biomarcadores indicativos de doenças específicas.

Isto é possível porque o sinal do espalhamento Raman para moléculas que não estão ligadas na superfície metálica é normalmente fraco, pois a luz visível que não é absorvida por esta molécula é apenas fracamente dispersa (inelasticamente) para fora das vibrações moleculares. Uma melhoria considerável ocorre na superfície das AuNP's, porque a intensidade dos sinais de Raman depende da quarta potência do campo elétrico local, que é muito alto na superfície do metal devido à ressonância plasmônica. Além disso, esta melhoria também é originada a partir do acoplamento eletrônico entre moléculas e a superfície metálica resultante da transferência de cargas [158]. Assim, a luz visível elasticamente espalhada pelas AuNP's pode ser visualizada utilizando um microscópio óptico de campo escuro. A superfície das AuNP's provoca um efeito SERS devido a moléculas adsorvidas proporcionando um espectro de Raman que conduz à identificação destas moléculas [159].

Um exemplo de aplicação na área biológica para o efeito SERS foi relatado primeiramente em 2007 por Lee e colaboradores [161], onde AuNP's funcionalizadas com PEG-tiol permitiu a conjugação de anticorpos monoclonais ScFv para a detecção de pequenos tumores. Na Figura 16 são apresentadas imagens obtidas por meio de SERS para a localização altamente sensível de marcadores de câncer específicos em células vivas utilizando nanobioconjugados de ouro com anticorpos monoclonais [161].

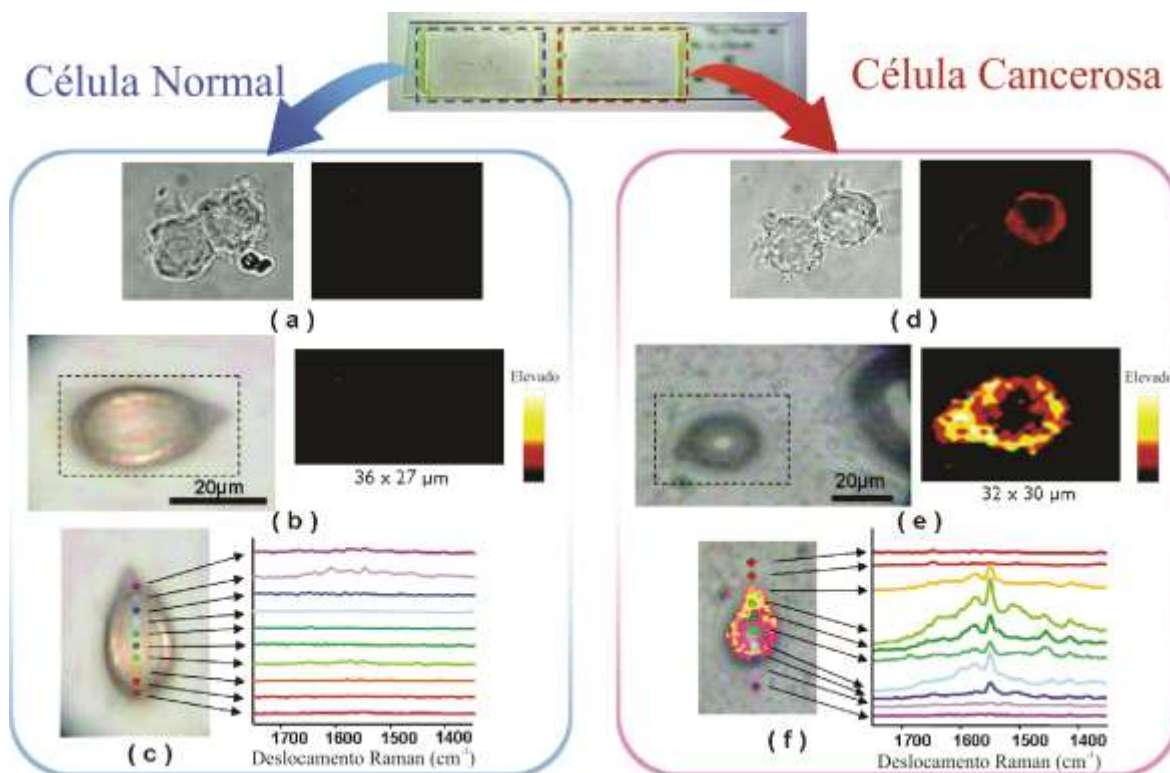


Figura 16. Imagens de fluorescência e SERS obtidas de células HEK293 normais e células HEK293 expressando PLC γ 1 (cancerosas). (a) Célula normal - Imagem de campo claro (à esquerda) e fluorescência (à direita); (b) Célula normal - Imagens SERS campo claro (esquerda) e mapeamento Raman (à direita); (c) Célula normal - mapeamento Raman. Manchas coloridas indicam os pontos de laser através do meio da célula ao longo do eixo Y; (d) Célula cancerosa - Imagem de campo claro (à esquerda) e fluorescência (à direita); (e) Célula cancerosa - Imagens SERS campo claro (esquerda) e mapeamento Raman (à direita); (f) Célula cancerosa - Mapeamento Raman. Manchas coloridas indicam os pontos de laser através do meio da célula ao longo do eixo Y. Adaptado de [161].

Além das aplicações apresentadas, a nanotecnologia tem permitido aos cientistas adaptarem NP's para uma ampla gama de aplicações, tais como observar reações químicas dentro células [162,163] e manipular respostas celulares [164,165]. O êxito no desenvolvimento destas tarefas conta com a possibilidade de sintetizar bioconjugados com o design desejado. Recentemente, nanopartículas de ouro têm sido exploradas para utilização em sensores colorimétricos comercializados pela *Nanosphere*®, como etiquetas fluorescentes (*Oxonica*®), agentes de contraste para as modalidades de imagem com base na coerência óptica, fotoacústica e fluorescência de dois fótons, bem como agentes fototérmicos para o tratamento do câncer e liberação controlada de fármacos (*Nanospectra Biosciences*®).

Atualmente, as nanopartículas podem ser modificadas com atributos específicos, tais como a solubilidade em água, a carga superficial, ou de reconhecimento específico,

possibilitando cada vez mais novas aplicações. Na Figura 17 é apresentado um esquema mostrando várias estratégias atualmente utilizadas para o uso de nanopartículas metálicas em sistemas biológicos.

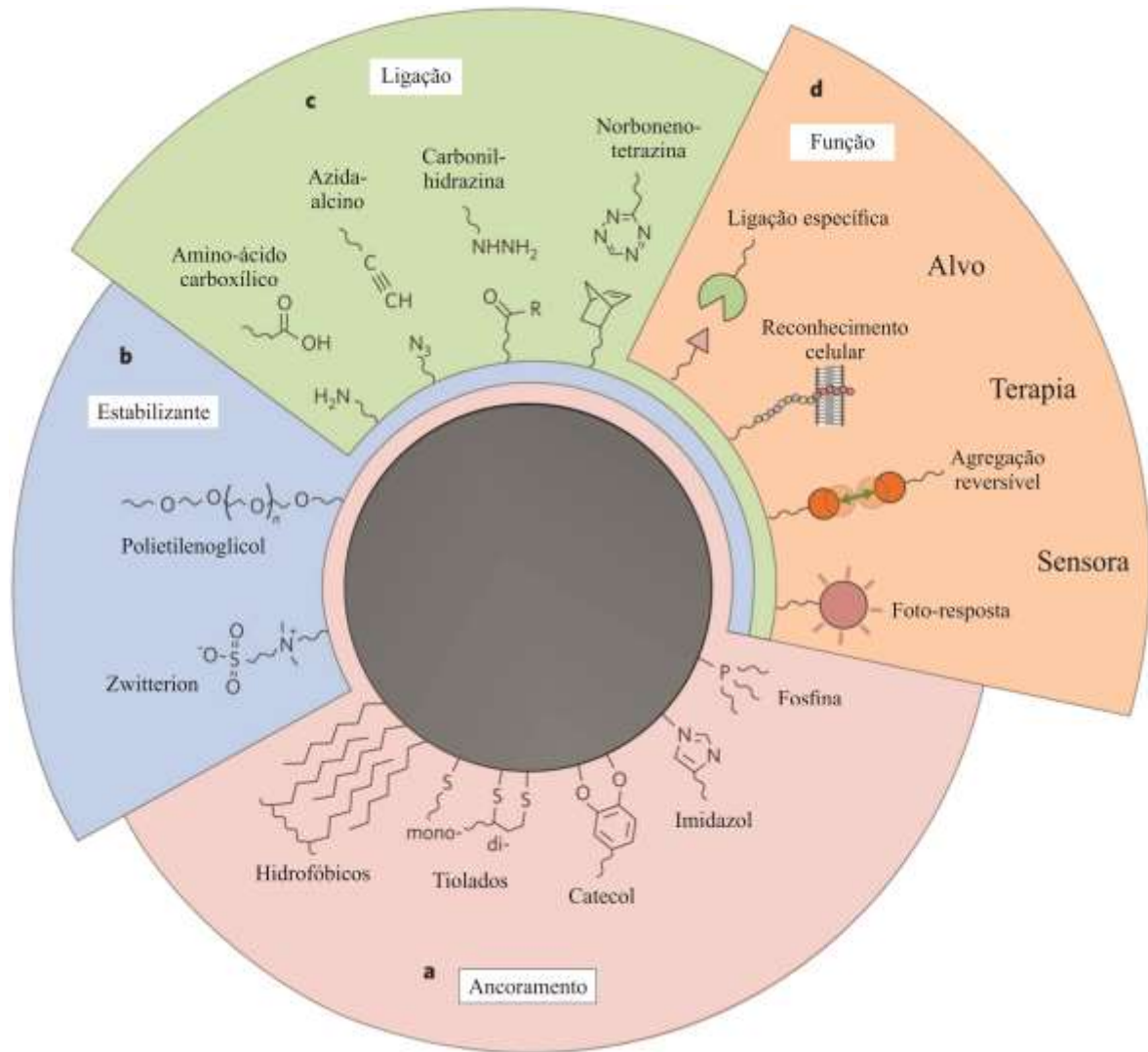


Figura 17. Esquema mostrando várias estratégias para a aplicação de nanopartículas em sistemas biológicos. Em (a) é mostrado moléculas que podem ancorar diretamente na superfície do nanocristal ou com os ligantes a ele associado. Em (b) é apresentado a possibilidade do uso de polímeros ou ligantes que são utilizados para estabilizar o colóide, como o polietilenoglicol (PEG) ou cadeias zwitteriônicas que interagem fortemente com as moléculas de água evitando adsorção inespecífica. Em (c) pode ser observado a possibilidade de acoplamento covalente por biomoléculas que apresentam grupos reativos. A parte representada em (d) mostra as unidades biofuncionais que podem conferir o reconhecimento, a capacidade terapêutica, a capacidade sensora e outras características desejáveis. Adaptado de [166].

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Klar T, Perner M, Grosse S, Von Plessen G, Spirkl W, Feldmann J. Surface-Plasmon Resonances in Single Metallic Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* 1998, 82: 4249-4252.
2. Cao YWC, Jin R, Mirkin CA. Fingerprints for DNA and RNA Detection Nanoparticles with Raman Spectroscopic. *Science.* 2002, 297: 1536-1540.
3. Averitt RD, Westcott SL, Halas NJ. Linear optical properties of gold nanoshells. *J. Opt. Soc. Am. B.* 1999, 16: 1824-1832.
4. Shahriari E, Yunus WMM, Saion E. Effect of particle size on nonlinear refractive index of Au nanoparticle in PVA solution. *Brazilian Journal of Physic.* 2010, 40:256-260.
5. Roh S, Chung T, Lee B. Overview of the Characteristics of Micro- and Nano-Structured Surface Plasmon Resonance Sensors. *Sensors.* 2011, 11: 1565-1588.
6. Tinguely JC, Sow I, Leiner C, Grand J, Hohenau A, Felidj N, Aubard J, Krenn J R. Gold Nanoparticles for Plasmonic Biosensing: The Role of Metal Crystallinity and Nanoscale Roughness. *BioNanoScience.* 2011, 1: 128-135.
7. Zargar B, Hatamie A. A simple and fast colorimetric method for detection of hydrazine in water samples based on formation of gold nanoparticles as a colorimetric probe. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2013, 182: 706-10.
8. Terentyuk GS, Maslyakova G N, Suleymanova L V, Khlebtsov N G, Khlebtsov B N, Akchurin G G, Maksimova I L, Tuchin V V. Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: toward cancer phototherapy. *J. Biomed Opt.* 2009, 14: 1-9.
9. Zhou Y, Dong H, Liu L, Li M, Xiao K, Xu M. Selective and sensitive colorimetric sensor of mercury (II) based on gold nanoparticles and 4-mercaptophenylboronic acid. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2014, 196: 106-11.
10. Peng G, Tisch U, Adams O, Hakim M, Shehada N, Broza YY, Bilan S, Abdah-Bortnyak R, Kuten A, Haick H. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotech.* 2009, 4: 669-73.
11. Stuchinskaya T, Moreno M, Cook MJ, Edwards DR, Russell DA. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011, 10: 822-31.
12. Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today.* 2007, 2: 18-29.
13. Sperling RA, Rivera-Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2008, 27:1896-1908.
14. El-Sayed MA. Small Is Different: Shape-, Size-, and Composition-Dependent Properties of Some Colloidal Semiconductor Nanocrystals. *Acc. Chem. Res.* 2004, 37: 326-333.
15. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, Jacks T, Anderson DG. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat. Rev. Cancer.* 2012, 12: 39-50.
16. Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* 2012, 112: 2739-2779.

17. Sukhanova A, Even-Desrumeaux K, Kisseli A, Tabary T, Reveil B, Millot J M, Chames P, Baty D, Artemyev M, Oleinkiov V. Oriented Conjugates Single-Domain Antibodies and Quantum Dots: Toward New Generation of Ultra-Small Diagnostic Nanoprobes. *NanoMedicine*. 2012, 8: 516–525.
18. Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Kelly KA, Patel P, Wolley A, Allport J R, Weissleder R. In Vivo Imaging of Activated Endothelium Using an Anti-VCAM-1 Magneto optical Probe. *Bioconjugate Chem*. 2005, 16: 576– 581.
19. Serrate D, Teresa JM, Marquina C, Marzo J, Saurel D, Cardoso FA, Cardoso S, Freitas P P, Ibarra MR. Quantitative Biomolecular Sensing Station Based on Magneto resistive Patterned Arrays. *Biosens. Bioelectron*. 2012, 35: 206– 212.
20. Susie E, El-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*. 2006, v. 35, n. 3, p. 209-217.
21. <https://ocg.cancer.gov/e-newsletter-issue/issue-11/translating-cancer-targets-nanotechnology-based-therapeutics>. Acesso em 04 de Agosto de 2016.
22. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev*. 2009, 38, 1759-1782.
23. Faraday M. The bakerian lecture: Experimental relations of gold (and other metals) to light, *Philos. Trans. R. Soc. Lond*. 1857, 147, 145–181.
24. Mie G. Beiträ"ge zur Optik tru"ber Medien speziell kolloidaler Goldlo" sungen (contributions to the optics of diffuse media, especially colloid metal solutions) *Ann. Phys*. 1908, 25, 377–445.
25. Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev*. 2004, 104, 293–346.
26. <http://www.ibtimes.co.uk/romans-used-nanotechnology-turn-lycurgus-cup-green-red-1600-years-ago-1468746>. Acesso em 30 de julho de 2016.
27. Polte J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm*. 2015, 17, 6809-6830.
28. Park J, Joo J, Kwon SG, Jang Y, Hyeon T. Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals, *Angew. Chem. Int. Ed*. 2007, 46, 4630–4660
29. Ostwald W. Über die vermeintliche Isomerie des roten und gelben Quecksilberoxyds und die Oberflächenspannung fester Körper, *Z. Phys. Chem*. 1900, 34, 495.
30. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc*. 1951, 11, 55.
31. Becker R, Doring W. Kinetic treatment of germ formation in supersaturated vapour. *Ann. Phys*. 1935, 24, 719–752.
32. LaMer VK. Nucleation in Phase Transitions, *Ind. Eng. Chem*. 1952, 44, 1270–1277.
33. LaMer VK, Dinegar RH. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols, *J. Am. Chem. Soc*. 1950, 72, 4847–4854.
34. Finney EE, Finke RG. Nanocluster nucleation and growth kinetic and mechanistic studies: A review emphasizing transition-metal nanoclusters, *J. Colloid Interface Sci*. 2008, 317, 351–374.

35. Xia Y, Xiong Y, Lim B, Skrabalak SE. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics?, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 48, 60–103.
36. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A, Turkevich. Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited *J. Phys. Chem. B.* 2006, 110: 15700– 15707.
37. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier JA. Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold *Discuss. Faraday Soc.* 1951, 11: 55– 75.
38. Frens G. Controlled Nucleation for Regulation of Particle-Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature, Phys. Sci.* 1973, 241: 20– 22.
39. Chow MK, Zukoski CF. Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability. *J. Colloid Interface Sci.* 1994, 165: 97– 109.
40. Freund PL, Spiro M. Colloidal Catalysis: The Effect of Sol Size and Concentration. *J. Phys. Chem.* 1985, 89: 1074– 1077.
41. Kumar S, Gandhi KS, Kumar R. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method *Ind. Eng. Chem. Res.* 2007, 46, 3128– 3136.
42. Georgiev P, Bojinova A, Kostova B, Momekova D, Bjornholm T, Balashev K. Implementing Atomic Force Microscopy (AFM) for Studying Kinetics of Gold Nanoparticle's Growth. *Colloids Surf. A.* 2013, 434:154– 163.
43. Ojea-Jiménez I, Romero FM, Bastús NG, Puentes V. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. *J. Phys. Chem. C.* 2010, 114:1800– 1804.
44. Ojea-Jiménez I, Campanera JM. Molecular Modeling of the Reduction Mechanism in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C.* 2012, 116: 23682– 23691.
45. Polte J, Herder M, Erler R, Rolf S, Fischer A, Würth C, Thünemann A F, Kraehnert R, Emmerling F. Mechanistic Insights into Seeded Growth Processes of Gold Nanoparticles. *Nanoscale.* 2010, 2: 2463– 2469.
46. Polte J, Erler R, Thünemann AF, Emmerling F, Kraehnert R. SAXS in Combination with a Free Liquid Jet for Improved Time-Resolved in Situ Studies of the Nucleation and Growth of Nanoparticles. *Chem. Commun.* 2010, 46: 9209– 9211.
47. Polte J, Ahner TT, Delissen F, Sokolov S, Emmerling F, Thünemann 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.* 2010, 132: 1296– 1301.
48. Polte J, Tujev X, Wuithschick M, Fischer A, Thuenemann AF, Rademann K, Kraenert R, Emmerling F. Formation Mechanism of Colloidal Silver Nanoparticles: Analogies and Differences to the Growth of Gold Nanoparticles. *ACS Nano.* 2012, 6: 5791– 5802.
49. Hendel T, Wuithschick M, Kettemann F, Birnbaum A, Rademann K, Polte J. In Situ Determination of Colloidal Gold Concentrations with UV–Vis Spectroscopy: Limitations and Perspectives. *Anal. Chem.* 2014, 86: 11115– 11124.
50. Polte J. Fundamental Growth Principles of Colloidal Metal Nanoparticles - a new Perspective. *Cryst. Eng. Comm.* 2015, 17, 6809-6830
51. Wuithschick M, Witte S, Kettemann F, Rademann K, Polte J. Illustrating the Formation of Metal Nanoparticles with a Growth Concept Based on Colloidal Stability. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, 17: 19895-19900.

52. Wuithschick M, Birnbaum A, Witte S, Sztucki M, Vainio U, Pinna N, Rademann K, Emmerling F, Kraehnert R, Polte J. Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. *ACS Nano*. 2015, 9: 7052-71.
53. Engelbrekt C, Jensen PS, Sørensen KH, Ulstrup J, Zhang J. Complexity of Gold Nanoparticle Formation Disclosed by Dynamics Study *J. Phys. Chem. C*. 2013, 117: 11818– 11828.
54. Chow MK, Zukoski, CF. Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability. *J. Colloid Interface Sci*. 1994, 165: 97– 109.
55. Freund PL, Spiro M. Colloidal Catalysis: The Effect of Sol Size and Concentration. *J. Phys. Chem*. 1985, 89: 1074– 1077.
56. Baptista PE, Pereira P, Eaton G, Doria A, Miranda I, Gomes P, Quaresma RF. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem*. 2008, 391:943-950.
57. Patungsawa W, Hodak JH. pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction. *Mater. Chem. Phys*. 2008, 108: 45-54.
58. Mikhlin Y, Karacharov A, Likhatski M, Podlipskaya T, Zubavichus Y, Veligzhanin A, Zaikovski V. Submicrometer intermediates in the citrate synthesis of gold nanoparticles: New insights into the nucleation and crystal growth mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011, 362: 330–336.
59. Shawn JT, Campolongo MJ, Luo D, Cheng W. Building plasmonic nanostructures with DNA. *Nature Nanotechnology*. 2011, 6,268–276.
60. Darvill D, Centeno A, Xie F. Plasmonic fluorescence enhancement by metalnanostructures: shaping the future of bionanotechnology. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2013, 15, 15709-15726.
61. Willets KA, Van Duyne RP. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem*. 2007, 58, 267–297.
62. Schultz S, Smith DR, Mock JJ, Schultz DA. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000, 97, 996–1001.
63. Yguerabide J, Yguerabide EE. Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. I. Theory. *Anal. Biochem*. 1998, 262, 137–156.
64. Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*. 2003, 301, 1884–1886.
65. Yonzon CR. Towards advanced chemical and biological nanosensors — an overview. *Talanta*. 2005, 67, 438–448.
66. Haes AJ, Chang L, Klein WL, Van Duyne P. Detection of a biomarker for Alzheimer's Disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor. *J. Am. Chem. Soc*. 2005, 127, 2264–2271.
67. Dahlin AB, Tegenfeldt JO, Hook F. Improving the instrumental resolution of sensors based on localized surface plasmon resonance. *Anal. Chem*. 2006, 78, 4416–4423.
68. McFarland AD, Van Duyne RP. Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *Nano Lett*. 2003, 3, 1057–1062.
69. Raschke G. Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering. *Nano Lett*. 2003, 3, 935–938.

- 70 Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*. 1997, 277, 1078–1081.
- 71 Jeanmaire DL, Van Duyne RP. Surface Raman spectroelectrochemistry. Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J. Electroanal. Chem. Interface Electrochem*. 1977, 84, 1–20.
- 72 Haynes CL, Yonzon CR, Zhang X, Van Duyne RP. Surface-enhanced Raman sensors: Early history and the development of sensors for quantitative biowarfare agent and glucose detection. *J. Raman Spectrosc*. 2005, 36, 471–484.
- 73 Jeffrey N. Anker¹, W. Paige Hall¹, Olga Lyandres¹, Nilam C. Shah¹, Jing. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials* 7, 442 - 453 (2008)
- 74 LM, Liz M. Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir*, 2006, 22, 32–41
- 75 Sarah Unser, Ian Bruzas, Jie He, and Laura Sagle*. Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing: Current Challenges and Approaches. *Sensors (Basel)*. 2015 Jul; 15(7): 15684–15716.
- 76 Jensen TR. Nanosphere lithography: Effect of the external dielectric medium on the surface plasmon resonance spectrum of a periodic array of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem*. 1999, B 103, 9846–9853.
- 77 Haes J, Haynes CL, Van Duyne RP. Nanosphere lithography: Self-assembled photonic and magnetic materials. *Mater. Res. Soc. Symp*. 2001, 636, D4.8.
- 78 Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev*. 2005, 105 (4), pp 1103–1170.
- 79 Sperling RA, Parak WJ. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A*. 2010, 368, 1333–1383.
- 80 Adamson AW, Gast AP. *Physico-Chemicals of Surfaces*, 6^a ed . Wiley-Interscience: New York. 1997.
- 81 Lin SY, Tsai YT, Chen CC, Lin CM, Chen CH. Two-step functionalization of neutral and positively charged thiols onto citrate-stabilized Au nanoparticles. *J. Phys. Chem*. 2004a, B 108:2134–2139.
- 82 http://www.echem.titech.ac.jp/~hara/?page_id=156. Acesso em 30/07/2016.
- 83 Bain, C. D, Troughton, E, B, Tao, Y, T, Evall, J, Whitesides, G, M, Nuzzo, R, G, J. *Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 321.
- 84 Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev*. 2005, 105:1103–1169.
- 85 Dubois LH, Zegarski BR, Nuzzo RG. *J. Chem. Phys*. 1993, 98, 678.
- 86 Li Z, Chang SC, Williams RS. Self-assembly of alkanethiol molecules onto platinum and platinum oxide surfaces. *Langmuir*. 2003, 19, 6744.

- 87 Mekhalif Z, Laffineur F, Couturier N, Delhalle J. Elaboration of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on nickel polycrystalline substrates: time, concentration and solvent effects. *Langmuir*. 2003, 19, 637.
- 88 Dollefeld H, Hoppe K, Kolny J, Schilling K, Weller H, Eychmuller A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002, 4, 4747.
- 89 Lee SM, Jun YW, Cho SN, Cheon J. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 11244.
- 90 Hostetler MJ, Templeton AC, Murray RW. Dynamics of place-exchange reactions on monolayer-protected gold cluster molecules. *Langmuir*. 1999, 15:3782–3789.
- 91 Aslan K, Pérez-Luna VH. Surface modification of colloidal gold by chemisorption of alkanethiols in the presence of a nonionic surfactant. *Langmuir*. 2002, 18:6059–6065.
- 92 Weisbecker CS, Merritt MV, Whitesides GM. Molecular self-assembly of aliphatic thiols on gold colloids. *Langmuir*. 1996. 12:3763–3772.
- 93 Mayya KS, Patil V, Sastry M. On the stability of carboxylic acid derivatized gold colloidal particles: the role of colloidal solution pH studied by optical absorption spectroscopy. *Langmuir*. 1997, 13:3944–3947.
- 94 Zhao Y, Perez-Segarra W, Shi Q, Wei A. Dithiocarbamate assembly on gold. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127:7328–7329.
- 95 Wang YA, Li JJ, Chen H, Peng X. Stabilization of inorganic nanocrystals by organic dendrons. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124:2293–2298.
- 96 Kim M, Chen Y, Liu Y, Peng X. Super-stable, high-quality Fe₃O₄ dendron-nanocrystals dispersible in both organic and aqueous solutions. *Adv. Mater.* 2005d, 17:1429–1432.
- 97 Levy R, Thanh NTK, Doty RC, Hussain I, Nichols J, Schiffrin D J, Brust M, Fernig DG. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126:10076–10084.
- 98 Nativo P, Prior IA, Brus M. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS Nano*. 2008, 2:1639–1644.
- 99 Bastus NG, Sanchez-Tillo E, Pujals S, Farrera C, Lopez C, Giralt E, Celada A, Loberas J, Puntès V. Homogeneous conjugation of peptides onto gold nanoparticles enhances macrophage response. *ACS Nano*. 2009, 3:1335–1344.
- 100 Gao X, Chan WC, W Nie S. Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding. *J. Biomed. Opt.* 2002, 7:532–537.
- 101 Sukhanova A, Even-Desrumeaux K, Kisseli A, Tabary T, Reveil B, Millot J M, Chames P, Baty D, Artemyev M, Oleinkiov V. Oriented Conjugates Single-Domain Antibodies and Quantum Dots: Toward New Generation of Ultra-Small Diagnostic Nanoprobes. *NanoMedicine*. 2012, 8: 516–525.
- 102 Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Kelly KA, Patel P, Wolley A, Allport J R, Weissleder R. In Vivo Imaging of Activated Endothelium Using an Anti-VCAM-1 Magneto optical Probe. *Bioconjugate Chem.* 2005, 16: 576–581.
- 103 Serrate D, Teresa JM, Marquina C, Marzo J, Saurel D, Cardoso F A, Cardoso S, Freitas PP, Ibarra MR. Quantitative Biomolecular Sensing Station Based on Magneto resistive Patterned Arrays. *Biosens. Bioelectron.* 2012, 35: 206–212.
- 104 Silvia F, Sally P, David AR, Kim ES. Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of the biosurfaces. *Trends Anal. Chem.* 2000, 19: 530-540.

- 105 Nikin P, Martyn CD, Mark H, Richard JH, Clive JR, Saul JBT, Philip MW. Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*. 1997, 13: 6485 -6490.
- 106 Kairdolf BA, Mancini MC, Smith AM, Nie S. Minimizing nonspecific cellular binding of quantum dots with hydroxyl-derivatized surface coatings. *Anal. Chem*. 2008a, 80:3029–3034.
- 107 Yezhelyev MV, Qi L, Regan RM, Nie S, Gao X. Proton-sponge coated quantum dots for siRNA delivery and intracellular imaging. *J. Am. Chem. Soc*. 2008, 130:9006–9012.
- 108 Wuister SF, Swart I, Van Driel F, Hickey SG, Donega CM. Highly luminescent water-soluble CdTe quantum dots. *Nanoletters*. 2003, 3:503–507.
- 109 Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Suga M, Sasaki YF, Ohta T, Yasuhara M, Suzuki K, Yamamoto K. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nanoletters*. 2004, 4:2163–2169.
- 110 Schellenberger EA, Reynolds F, Weissleder R, Josephson L. Surface-functionalized nanoparticle library yields probes for apoptotic cells. *ChemBioChem*. 2004, 5:275–279.
- 111 Sukhanova A. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cell. *Anal. Biochem*. 2004, 324:60–67.
- 112 Sun EY, Josephson L, Kelly KA, Weissleder R. Development of nanoparticle libraries for biosensing. *Bioconjugate Chem*. 2006b, 17:109–113.
- 113 Susumu K, Uyeda HT, Medintz IL, Pons T, Delehanty JB, Mattoussi H. Enhancing the stability and biological functionalities of quantum dots via compact multifunctional ligands. *J. Am. Chem. Soc*. 2007, 129:13987–13996.
- 114 Kuhn SJ, Finch SK, Hallahan DE, Giorgio TD. Facile production of multivalent enzyme-nanoparticle conjugates. *J. Magn. Magn. Mater*. 2007, 311:68–72.
- 115 Green N. Avidin. *Adv. Protein Chem*. 1975, 29:85–133.
- 116 Wilchek M, Bayer EA. The avidin–biotin complex in bioanalytical applications. *Anal. Biochem*. 1988, 171:1–32.
- 117 Wilchek M, Bayer EA. Avidin–biotin technology ten years on:has it lived up to its expectations? *Trends Biochem. Sci*. 1989, 14:408–412.
- 118 Wilchek M, Bayer EA. *Enzymol. Avidin–biotin technology*. 1990, 184, pp 3–746.
- 119 Skaff H, Emrick T. The use of 4-substituted pyridines to afford amphiphilic, PEGylated cadmium selenide nanoparticles. *Chem. Commun*. 2003,1: 52–53.
- 120 Pinaud F, King D, Moore HP, Weiss S. Bioactivation and cell targeting of semiconductor CdSe/ZnS nanocrystals with phytochelatin-related peptides. *J. Am. Chem. Soc*. 2004, 126:6115–6123.
- 121 – Lorena García Fernández. Introducing gold nanoparticle bioconjugates within the biological machinery . PhD Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona. 2013
122. Nezlin, R. *The Immunoglobulins: Structure and Function*. Elsevier Inc., 1998.

123. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Freeman, L. S. *Biochemistry*, 6th edition. W.H. Freeman, 2006
- 124 - AMIT, A.; MARIUZZA, R.; PHILLIPS, S.; POLJAK, R. 3-Dimensional structure of an antigen–antibody complex at 2.8-Å resolution, *Science* 233 747–753 (1986).
- 125- MONTENEGRO, Jose-Maria et al. Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 65, n. 5, p. 677-688, 2013.
- 126 - WOOF, Jenny M.; KERR, Michael A. IgA function–variations on a theme. *Immunology*, v. 113, n. 2, p. 175-177, 2004.
- 127 - TOKONAMI, Shiho; SHIIGI, Hiroshi; NAGAOKA, Tsutomu. Review: micro-and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications. *Analytica chimica acta*, v. 641, n. 1, p. 7-13, 2009
- 128 - RONKAINEN, Niina J.; HALSALL, H. Brian; HEINEMAN, William R. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.
- 129 - X. Zhao, F. Pan, J. Lu, Interfacial assembly of proteins and peptides: recent examples studied by neutron reflection, *J. R. Soc. Interface* 6 (2009) S659–S670.
- 130 - X. Zhao, F. Pan, B. Cowsill, J. Lu, Interfacial immobilization of monoclonal antibody and detection of human prostate-specific antigen, *Langmuir* 27 (2011) 7654–7662.
- 131 - S. Puertas, M. Moros, R. Fernandez-Pacheco, M.R. Ibarra, V. Grazu, J.M. de la Fuente, Designing novel nano-immunoassays: antibody orientation versus sensitivity, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 43 (2010) 474012.
- 132 - J. Wang, Y. Cao, Y. Xu, G. Li, Colorimetric multiplexed immunoassay for sequential detection of tumor markers, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2009) 532–536.
- 133 - P.-C. Lin, S.-H. Chen, K.-Y. Wang, M.-L. Chen, A.K. Adak, J.-R.R. Hwu, Y.-J. Chen, C.-C. Lin, Fabrication of Oriented Antibody-Conjugated Magnetic Nanoprobes and Their Immunoaffinity Application, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8774–8782.
- 134 - I. Koh, R. Hong, R. Weissleder, L. Josephson, Nanoparticle–target interactions parallel antibody–protein interactions, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3618–3622.
- 135 - C. Kaittanis, S. Santra, J.M. Perez, Role of nanoparticle valency in the nondestructive magnetic-relaxation-mediated detection and magnetic isolation of cells in complex media, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 12780–12791.
- 136 - T.C. Granade, S. Workman, S.K. Wells, A.N. Holder, S.M. Owen, C.-P. Pau, Rapid detection and differentiation of antibodies to HIV-1 and HIV-2 using multivalent antigens and magnetic immunochromatography testing, *Clin. Vaccine Immunol.* 17 (2010) 1034–1039.
- 137 - R.S. Gaster, D.A. Hall, C.H. Nielsen, S.J. Osterfeld, H. Yu, K.E. Mach, R.J. Wilson, B. Murmann, J.C. Liao, S.S. Gambhir, S.X. Wang, Matrix-insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine, *Nat. Med.* 15 (2009) 1327–1332.
- 138 - G. Baio, M. Fabbi, S. Salvi, D. de Toter, M. Truini, S. Ferrini, C.E. Neumaier, Two-step in vivo tumor targeting by biotin-conjugated antibodies and superparamagnetic nanoparticles assessed by magnetic resonance imaging at 1.5 T, *Mol. Imaging Biol.* 12 (2010) 305–315.

- 139 - K. Aurich, G. Glöckl, E. Romanus, P. Weber, S. Nagel, W. Weitschies, Magneto-optical relaxation measurements for the characterization of biomolecular interactions, *J. Phys. Condens. Matter* 18 (2006) S2847–S2863.
- 140 - Y. Jung, J. Lee, H. Jung, B. Chung, Self-directed and self-oriented immobilization of antibody by protein G-DNA conjugate, *Anal. Biochem.* 79 (2007) 6534–6541.
- 141 - S. Kumar, J. Aaron, K. Sokolov, Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 314–320.
- 142 - Y. Jung, J. Jeong, B. Chung, Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports, *Analyst* 133 (2008) 697–701.
- 143 Faulk WP, Taylor GM. An Immunocolloid Method for the Electron Microscope. *Immunochem.* 1971, 8, 1081-1083.
- 144 Piras M, Salis A, Piludu M, Steri D, Monduzzi M. 3D vision of human lysozyme adsorbed onto a SBA-15 nanostructured matrix. *Chem. Commun.* 2011, 47, 7338-7340.
- 145 Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science.* 1998, 281: 2013–2016.
- 146 Chan WCW, Nie SM. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science.* 1998;281:2016–2018.
- 147 Wang S, Mamedova N, Kotov NA, Chen W, Studer J. Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates. *Nano Letters.* 2002;2:817–822.
- 148 Mah C, Zolotukhin I, Fraites TJ, Dobson J, Batich C, Byrne BJ. Microsphere-mediated delivery of recombinant AAV vectors in vitro and in vivo. *Mol Therapy.* 2000;1:239
- 149 Panatarotto D, Prtidos CD, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, Briand JP, Muller S, Prato M, Bianco A. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chemistry&Biology.* 2003;10:961–966.
- 150 Edelstein RL, Tamanaha CR, Sheehan PE, Miller MM, Baselt DR, Whitman LJ, Colton RJ. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosensors Bioelectron.* 2000;14:805–813.
- 151 Nam JM, Thaxton CC, Mirkin CA. Nanoparticles-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science.* 2003;301:1884–1886.
- 152 Mahtab R, Rogers JP, Murphy CJ. Protein-sized quantum dot luminescence can distinguish between "straight", "bent", and "kinked" oligonucleotides. *J Am Chem Soc.* 1995;117:9099–9100.
- 153 Ma J, Wong H, Kong LB, Peng KW. Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. *Nanotechnology.* 2003;14:619–623.
- 154 Isla A, Brostow W, Bujard B, Estevez M, Rodriguez JR, Vargas S, Castano VM. Nanohybrid scratch resistant coating for teeth and bone viscoelasticity manifested in tribology. *Mat Resr Innovat.* 2003;7:110–114.
- 155 Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. *J Magn Magn Mater.* 1999;194:176–184.

- 156 Molday RS, MacKenzie D. Immunospecific ferromagnetic iron dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J Immunol Methods*. 1982;52:353–367.
- 157 Weissleder R, Elizondo G, Wittenburg J, Rabito CA, Bengel HH, Josephson L. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology*. 1990;175:489–493.
- 158 Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev*. 2009, 38, 1759-1782.
- 159 Murphy CJ, Gole AM, Hunyadi SE, Stone JW, Sisco PN, Alkilany A, Kinard BE e Hankins P. *Chem. Commun*. 2008, 544-557.
- 160 Qian XH, Peng DO, Ansari Q, Yin-Goen GZ, Chen DM, Shin L, Yang AN, Young MD, Wang SN. *Nat. Biotechnol*. 2008, 26 , 83-90.
- 161 Lee S, Kim S, Choo J, Shin SY, Lee YH, Choi HY, Ha S, Kang K, Oh CH. *Anal. Chem*. 2007, 79 , 916-922.
- 162 Kreft O, Javier AM, Sukhorukov GB, Parak WJ. Polymer Microcapsules as Mobile Local pH-Sensors. *J. Mater. Chem.*, 2007, 17, 4471-4476.
- 163 Kim C, Agasti SS, Zhu Z, Isaacs L, Rotello VM. Recognition-Mediated Activation of Therapeutic Gold Nanoparticles Inside Living Cells. *Nat. Chem*. 2010, 2, 962–966.
- 164 Jiang W, KimBetty YS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-Mediated Cellular Response is Size-Dependent. *Nat. Nano*. 2008, 3, 145-150.
- 165 Huang YF, Liu H, Xiong X, Chen Y, Tan W. Nanoparticle-Mediated IgE–Receptor Aggregation and Signaling in RBL Mast Cells. *J. Am. Chem. Soc*. 2009, 131, 17328-17334.
- 166 Boles MA, Ling D ,Hyeon T, Talapin DV. The surface science of nanocrystals. *Nature Materials*. 2016, 15,141–153.

Artigo I

A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling

Abstract

The interest in applying gold nanoparticles is principally based on their monodispersity. Therefore, the synthesis of monodisperse gold nanocrystals has a key role in designing nanomaterials for their specific application. However, it can represent a cutting edge for many labs, mainly because it requires a variety of complex techniques for properly characterizing metal nanoparticles with expensive and rugged equipment. Herein, we propose an approach to synthesize nanoparticles with controlled monodispersity that can be adjusted through the factorial experimental plan 3^2 using response surface modelling (RSM). Our findings illustrate how factorial design is important to providing accurate projections of nanoparticles production using different chemical reducers. The proposed method leverages facile and inexpensive routes to synthesize monodisperse gold nanocrystals without the assistance of time-consuming image-based characterization tools.

Keywords: Gold nanoparticles; Growth steps; Experimental design; Response surface methodology.

1. INTRODUCTION

Gold nanoparticles (AuNP's) have been widely employed in countless fields. Their size, shape and chemical interaction capability offer unique physicochemical properties [1-5]. Such nanocrystals can exhibit very particular and often tunable properties through size and shape features. However, the synthesis of AuNP's can be significantly affected by various synergistic factors such as concentration, temperature, synthesis time and pH [6-8]. Protocols that enable the production of AuNP's with controlled size, shape and composition are therefore of key importance. In particular, current research efforts have been focusing on understanding the correlation between optical, electrical and magnetic properties of nanomaterials with their morphological characteristics [6, 9-14].

Historically, sodium citrate and borohydride are the most popular reducing agents but they produce very different outcomes. AuNP's synthesized with sodium citrate provides monodispersity and spherical shape. Sodium borohydride yields a synthesis with high concentration of nanoparticles [10,12]. Recently, it has been demonstrated that the synthesis of monodispersed gold nanoparticles can be achieved using 5-hydroxyl-1,4-naphthoquinone, and stabilized by poly(hydroxyl-1,4-naphthoquinone) [13]. There have been also efforts toward developing mathematical models for controlling the gold nanoparticles production [9,16].

Here we demonstrating how localized surface plasmon resonance (LSPR) can be used as the main characteristic of monodispersity, controlling time and molar ratio. Through the factorial experimental plan 3^2 using response surface modelling (RSM). Spectroscopic properties of nanoparticles can provide an indicator of their size distribution by fitting the position of the surface plasmon resonance (SPR) to a simple wavelength function [18-20].

There are two basic techniques to characterize metal nanoparticles: Spectroscopic methods (e.g., UV-visible absorption and Raman scattering) and Microscopy (e.g., transmission electron and scanning atomic force). The most common tool to provide reliable diagnostic of size distribution is electron microscopy. But this still is an expensive, time consuming and mostly inaccessible method in terms of required materials and infrastructure [17]. On the other hand, UV-visible spectroscopy is a accessible and therefore widely used in the study of nanomaterials; from a basic diagnostic of nanoparticle formation to the assessment of their complex interactions with other elements.

RSM is an statistical technique that uses quantitative data, obtained from appropriately designed experiments, to determine regression model and operating conditions [21-24]. In this article, we propose for the first time that RSM can be used to predict the mono or polydispersity of AuNP's, for both sodium citrate and borohydride synthesis protocols, and validate our claims by transmission electron microscopy (TEM) measurements. The approach allows the possibility of modulate. We report a general strategy for a factorial design that enables a facile synthesis process and demonstrate the possibility of dispersity control to sodium citrate and borohydride.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Synthesis of gold nanoparticles

Trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck Co. Ltd., Brazil) and sodium borohydride (NaBH_4 , Merck Co. Ltd., Brazil) were the reducing agents. All the vials were made from borosilicate glass. Ultrapure water was purified with Easy Pure II, Thermo

Scientific. Size-controlled preparation of gold nanoparticles was achieved through a chemical reduction. Gold precursor (HAuCl_4 , Merck Co. Ltd., Brazil) was maintained at 2.5×10^{-4} M, and different percentages of reducing agent ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ and NaBH_4) were added according to an experimental plan. Trisodium citrate was added to the gold precursor solution at 100°C , and borohydride was added in ice bath (0°C). Solution was maintained under agitation (200 rpm) as pre-defined by the experimental model.

2.2 Characterizations

AuNP's samples were collected at each stage immediately after synthesis and their optical properties were evaluated by UV-Vis spectrophotometry (FEMTO 800 XI). Size and morphology were examined by transmission electron microscope (JEOL, JEM-1400) operated at 120 kV. AuNP's diameters were calculated using Image J, version 1.4. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) was recorded on a ZEISS EVO MA10 at 30 kV with Oxford Instruments X-max large area.

2.3 Experimental Design and Optimization

RSM is a technique to design factorial experiments in order to build mathematical models to allow assessing the interplay of several factors onto a desired response. It is suitable for multi-factor experiments. It is also useful when searching for connections between various parameters to produce the most favorable outcomes. The synthesis process of AuNPs was optimized by a two factors, three level central composite design (CCD) with concentration of reducer (% w/v) and time synthesis (min) as the independent variables (Table 1). The full-width at half-maximum (FWHM) as a function of AuNPs plasmonic band was used as response variable.

Table 1. Experimental factors and levels in the central composite design.

Factors	Levels		
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)
Concentration % (w/v)	0.067	0.133	0.200
Time (min)	05	10	15

The responses obtained from the CCD was subjected to second-order multiple regression analysis as well as analysis of variance (ANOVA) at 5% confidence level (P -value < 0.05). This was used to explain the overall behavior of the system as well as the justification of the significance and adequacy of the developed regression model using the least square regression methodology. Each experimental run of the CCD matrix was analyzed and the response was correlated with the two input variables by following the quadratic polynomial equation (Eq.1). All the analysis was carried out using STATISTICA 10.0.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

where Y represents the predicted response, the constant terms β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} are the coefficients for constant offset, linear, quadratic, and interaction effects, respectively, x_i and x_j are the chosen independent variables and ε is a random transgression.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Characterizations of gold nanoparticles

Optical properties of the AuNPs were studied by UV-vis absorption spectroscopy, strong absorption bands are observed around 540 nm and 520 nm for the spectra of AuNP's synthesized with citrate (Cit-AuNPs) in Fig.1(A) and borohydride (BH-AuNPs) in Fig.1(B), respectively. The effect of the reducing agent and the synthesis time on the

plasmonic resonance peak of AuNPs are also presented. The greater peak in Cit-AuNPs in Fig. 1(A) was relative to a smaller concentration of reducing agent and more time than was evident in BH-AuNPs peaks in Fig. 1(B) (0,067 % w/v and 15 minutes; 0,200 % w/v and 5 minutes, respectively). Furthermore, note that the plasmonic resonance peak of Cit-AuNP had lower amplitude than BH-AuNP at the identical experimental conditions.

The peak position, intensity and band shape of the SPR is dependent on factors such as shape, size, composition and dielectric constant of the surrounding medium[17,25]. Thus, the shifting of the Cit-AuNP's LSPR compared with BH-AuNP's may be interpreted in terms of the electron cloud oscillation of Au atoms. However, enlargement of the band is related with shape and size uniformity of the nanostructures in the sample. Polydispersity promotes wider absorbance bands, and monodispersity narrower ones (Jana et al., 2001; Sau et al., 2001). The results with low concentration of borohydride did not show a characteristic plasmon peak as can be seen in Fig. 1(B), probably because the supersaturation condition reached by Au⁰ atoms, which formed the first cores with a size of less than 2 nm and thus did not absorb in the visible spectrum [26].

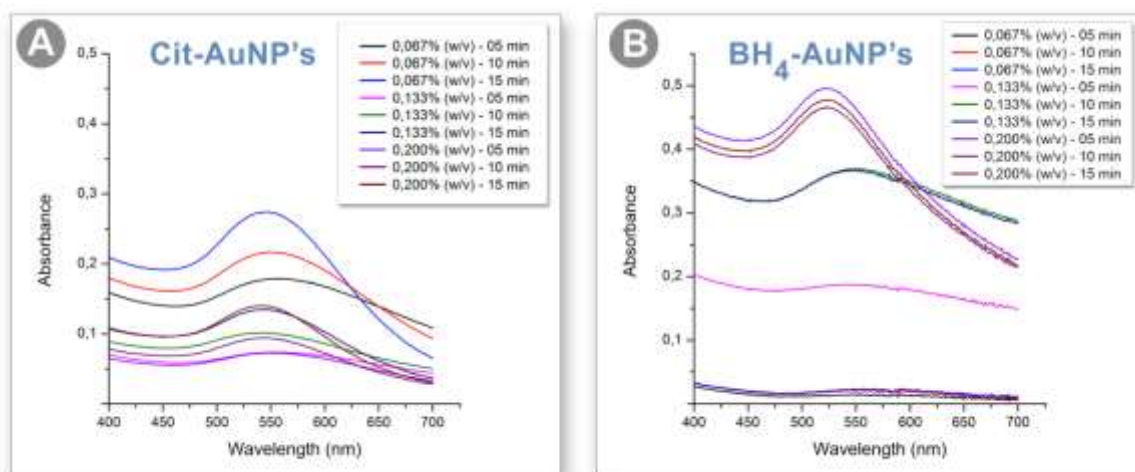


Figure 1. UV-vis absorption spectroscopy measurements of the colloidal gold nanoparticles synthesized with sodium citrate (A) and borohydride (B) in different concentrations (0.067, 0.133 and 0.200 % w/v) and times (5, 10 and 15 min).

The reduction capacity of borohydride has attracted considerable attention owing to its ability of generating a high concentration of nanocrystals with small nuclei in a short time (Brust et al., 1994; Brust et al., 1995). Previous studies have shown that with citrate, small variations of synthesis time promote significant change in both size and concentration of nanoparticles [6,15,17,25,29]. The higher nucleation ability borohydride favors the formation of a large number of cores, disfavoring the process of growth of the nanostructures. Therefore, borohydride unleashes a disordered growth process leading to a greater diversity in terms of nanoparticle size. On the other hand, citrate ions promote the formation of nuclei and stability the gold nanoparticles, which leads to the monodispersion effect. TEM images in Fig. 2 and Fig. 3 were performed in order to analyze the different conditions of growth, alongside with UV-Vis absorbance levels of the evaluated conditions in terms of concentration and synthesis time, respectively.

In Fig. 2 we used three samples of gold nanoparticles produced with increasing concentrations of citrate and borohydride. In order to illustrate the influence of concentration on monodispersity, the overlapping histograms for TEM images of Cit-AuNPs and BH-AuNPs are shown in Fig. 2(A-F) and Fig. 2(H-M), respectively. UV-Vis absorbance levels of the correspondent evaluated conditions are in Fig. 2(G) and Fig. 2(N).

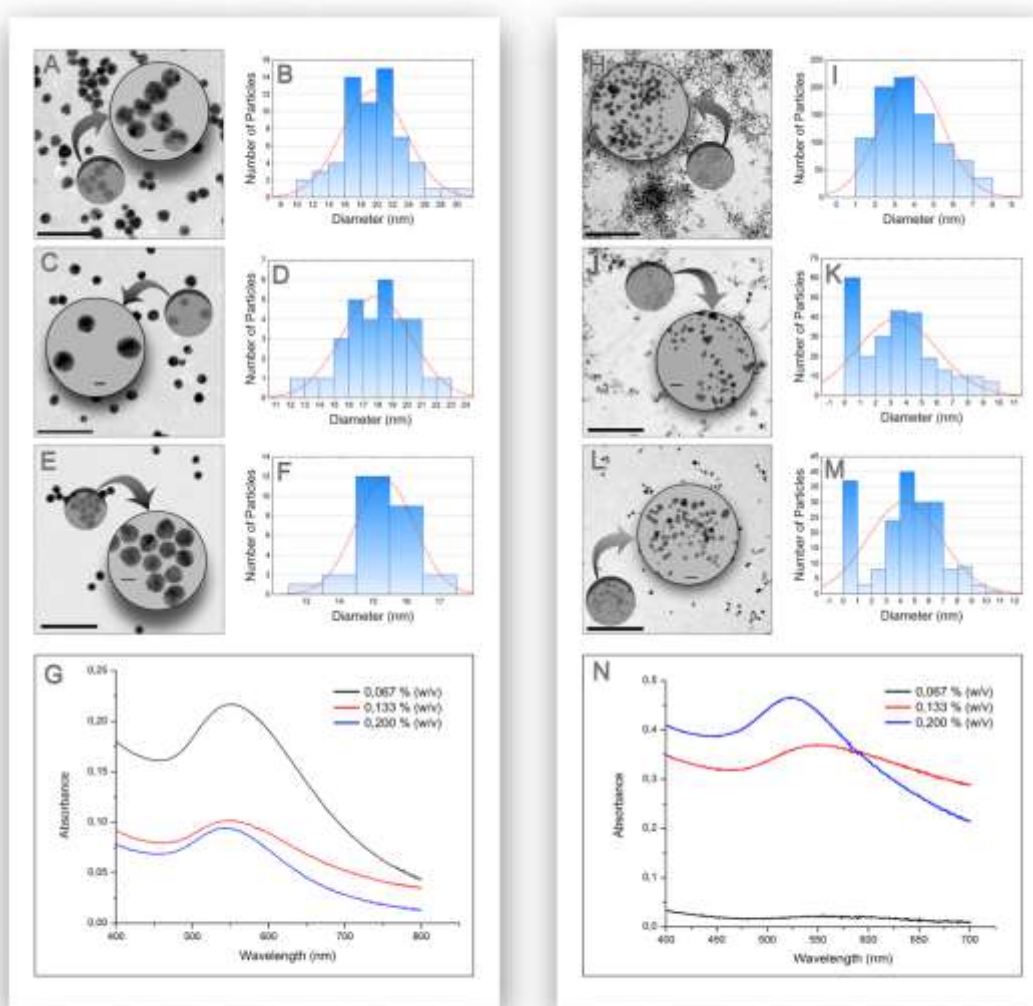


Figure 2. TEM images of gold nanoparticles (with a reaction time of 10 minutes) produced with different concentrations of citrate; 0.067 % (A); 0.133% (C) and 0.200 % (E); and borohydride 0.067 % (H); 0.133% (J) and 0.200 % (L); Scale bar 100 nm and 10 nm inset. The corresponding histograms (B, D, F and I, K, M) and UV-Vis absorbance levels of the evaluated conditions, Cit-AuNPs (G) and BH-AuNPs (N).

The synthesis time study is presented in Fig. 3. It is interesting to highlight the influence of time in the process with borohydride. Citrate has presented greater uniformity and larger size for longer synthesis time.

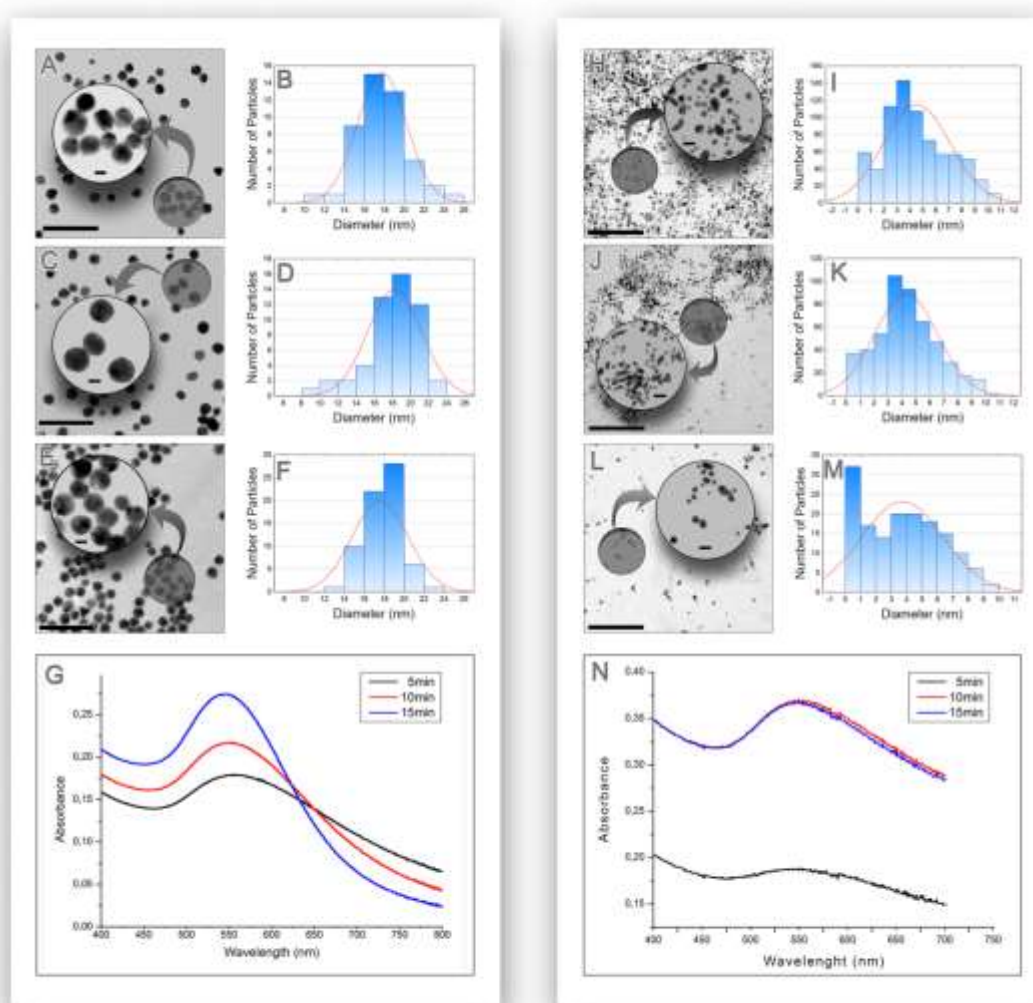


Figure 3. TEM images of gold nanoparticles (with the average concentration of the precursor) produced with citrate: 5 min (A); 10 min (C) and 15 min (E); and borohydride: 5 min (H); 10 min (J) and 15 min (L); Scale bar 100 nm and 10 nm (inset). The corresponding histograms are shown beneath (B, D, F and I, K, M) and UV-Vis spectrum showing different absorbance levels of the evaluated conditions, Cit-AuNPs (G) and BH-AuNPs (N).

In order to validate the results presented above, samples that reach higher absorbance values were characterized to better understand their composition. It was performed by using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis (Fig. 4) in order to confirm the composition of AuNPs and the presence of other elements. The greater Au peaks were

acquired around 2.3 Kev for both Cit-AuNPs (Fig. 4A) and BH-AuNPs (Fig. 4B), proving that synthesized nanoparticles have the same composition.

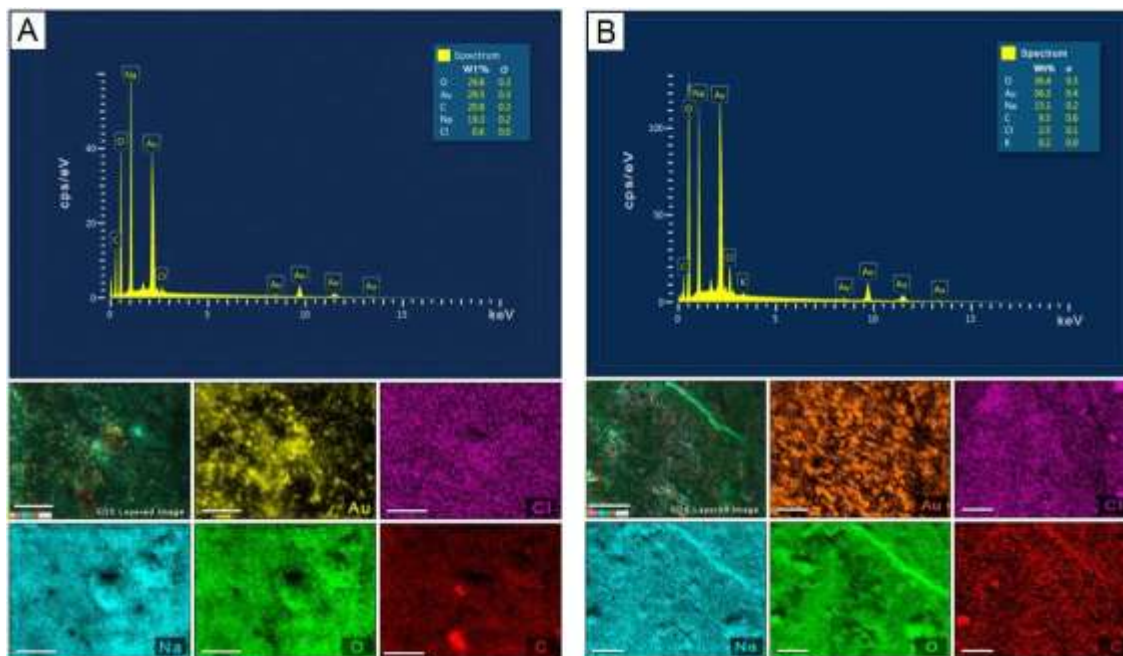


Figure 4. Energy dispersive spectroscopy on the scanning electron microscope (EDS-SEM). EDS analysis of gold nanoparticles synthesized from sodium citrate (A) and borohydride (B), inset shows EDS analysis area. EDS map showing detection of gold (yellow and orange), chloride (purple), sodium (cyan), oxygen (green) and carbon (red). Scale bars: 30 μm .

Considering that both reducing agents influenced the nanoparticles growth in different ways, our investigation now aims at examining interactions between factors considered important. For this end, we need statistical design but trying out a technique allowing us the manipulation of few experimental subjects while maintaining the same level of statistical confidence.

3.2 Optimization studies and Statistical Analysis

Here we used two variables, the concentrations of reducing agents and the reaction times are our input variables, and FWHM as the output. Various parameters could be used as response variable. However, the choice was based on the technique which requires lower-cost equipment, a fact which will give the possibility of reproducing the results presented here for research and teaching laboratories around the world and even applicable in outdoor synthesis in field-trials with nanoparticles. The FWHM criterion is potentially a very sensitive measurement for monodispersity. When nanoparticles are applied as sensors, the narrower is peak the better signal to noise ratio, allowing to the detection smaller changes in the experiment. The influence of the FWHM in absorption spectra for monodispersity and polydispersity is illustrated in Fig. 5.

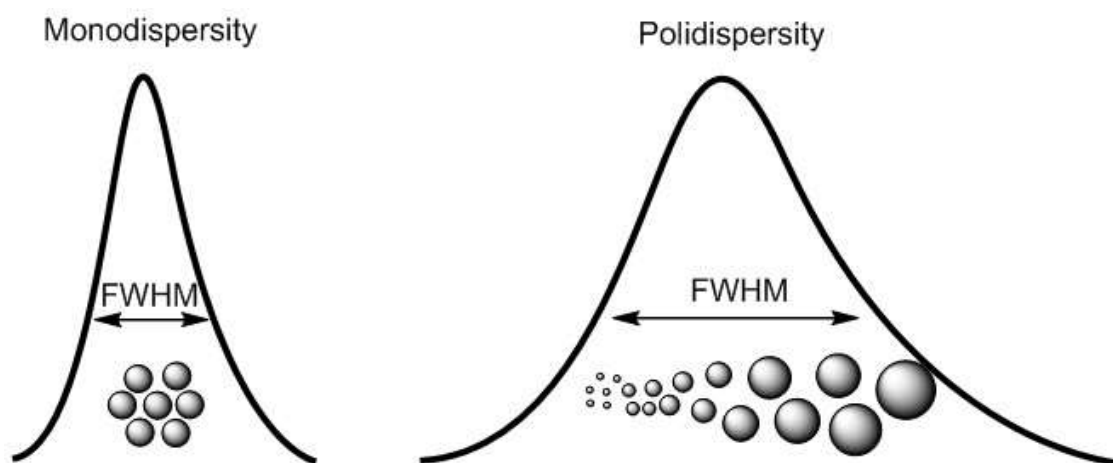


Figure 5 - Concept behind absorption spectra of gold nanoparticles with different dispersity. Low FWHM indicates monodispersity, while higher values indicate polydispersity of particles.

The experimental matrix and their responses based on an experimental plan for the synthesis of gold nanoparticles are listed in Table 2. Moreover, we insert the data of the resulting FWHM of absorbance in visible region.

Table 2. Data of 3² factorial planning.

Run	REACTION CONDITIONS		FWHM (nm)	
	Concentration % (w/v)	Time (min)	Citrate	Borohydride
1	0.067 (-1)	5 (-1)	107,5836	7,3368
2	0.067 (-1)	10 (0)	96,3185	45,5605
3	0.067 (-1)	15 (+1)	85,6576	56,1405
4	0.133 (0)	5 (-1)	98,7749	69,4385
5	0.133 (0)	10 (0)	87,8312	100,0877
6	0.133 (0)	15 (+1)	80,8989	94,1112
7	0.200 (+1)	5 (-1)	93,1372	64,5451
8	0.200 (+1)	10 (0)	80,9219	63,1133
9	0.200 (+1)	15 (+1)	76,1681	64,4112
10	0.133 (0)	10 (0)	87,8312	99,0933
11	0.133 (0)	10 (0)	89,8885	100,0543

To evaluate the statistical significance, analysis of variance (ANOVA) was performed to the best fit for the model (Table 3). The ANOVA of both reducing agents revealed that all independent variables were significantly related to FWHM, with a significance level of 0.05.

Table 3 ANOVA of nanoparticles' synthesis.

Citrate	SQ*	DF*	MS*	F*	P*
(1)Concentration % (w/v)(L)	257.8415	1	257.8415	163.4119	0.000052
Concentration % (w/v)(Q)	0.6826	1	0.6826	0.4326	0.539781
(2)Time (min)(L)	536.8005	1	536.8005	340.2075	0.000009
Time (min)(Q)	7.2052	1	7.2052	4.5664	0.085650
1L by 2L	6.1231	1	6.1231	3.8807	0.105932
Error	7.8893	5	1.5779		
Total SS	818.5226	10			
<i>R² (coefficient of determination) of the model is 0,99655; adjusted R² = 0,98277</i>					
Borohydride -					
(1)Concentration % (w/v)(L)	1149.048	1	1149.048	34.9045	0.001978
Concentration % (w/v)(Q)	3919.070	1	3919.070	119.0493	0.000112
(2)Time (min)(L)	892.023	1	892.023	27.0969	0.003451
Time (min)(Q)	352.166	1	352.166	10.6977	0.022181
1L by 2L	598.752	1	598.752	18.1882	0.007978
Error	164.599	5	32.920		
Total SS	8057.701	10			
<i>R² (coefficient of determination) of the model is 0,99992; adjusted R² = 0,9996</i>					

*SQ – Sum of Squares; DF – Degrees of Freedom; MS – Mean Square; F – test statistic; P - p value; L – linear; Q – Quadratic. The significant variables are shown in bold.

The analysis of variance (ANOVA) with Fisher's statistical analysis was used to examine the significance and adequacy of the model. P value less than 0.05 were significant and showed in bold. The predicted R²'s of 0.99655 for the FWHM of Cit-AuNP's and 0.99992 for the FWHM of BH-AuNP's were in rational agreement with the adjusted R²'s (0.98277 for the FWHM of Cit-AuNP's, and 0.9996 for the FWHM of BH-AuNP's), which confirms that the models may produce good predictability.

The Response Surface Modelling was developed with the aim of: (i) understanding the topography of the response surface (local maximum, local minimum and ridge lines), and (ii) finding the region where the optimal response occurs. RSM is commonly used statistical method for optimizing the process variables and constructing the quadratic

models illustrating the statistical relationship among the parameters considered. The empirical relationship between FWHM obtained of absorption spectra of the gold nanoparticles and the experimental factors are presented by Eq. (2) and Eq.(3) for Cit-AuNPs and BH-AuNPs, respectively .

$$\text{FWHM}_{\text{Cit}} = 89,7589 - 13,1108c - 18,9175 t, \quad (2)$$

$$\text{FWHM}_{\text{BH}} = 62,746 + 27,677 c + 37,684 c^2 + 24,386 t + 10,123 t^2 - 24,469 ct - 7,593 ct^2 + 5,842 c^2t^2 \quad (3)$$

where, c is concentration of the respective reducer agent and t is time synthesis.

RSM was applied to identify the variables and interactions that affect gold nanoparticle synthesis ($p < 0.05$). The goal of this analysis is to gain a better understanding of potential optimizations that could be performed in the synthesis process. Therefore, the RSM allows us confirming the results described above, as well as finding specific trends. The surface graphs shows the influence of variables on FWHM (Figs. 6(A) and 6(B)). The Pareto's chart was used to summarize and display the relative importance of the differences between groups of data (Figs. 6(B) and 6(F)). The Figs 6(C), 6(D), 6(G,) and 6(H) show the influences of each of the variables (concentration and time) on the FWHM for citrate and borohydride systems, respectively.

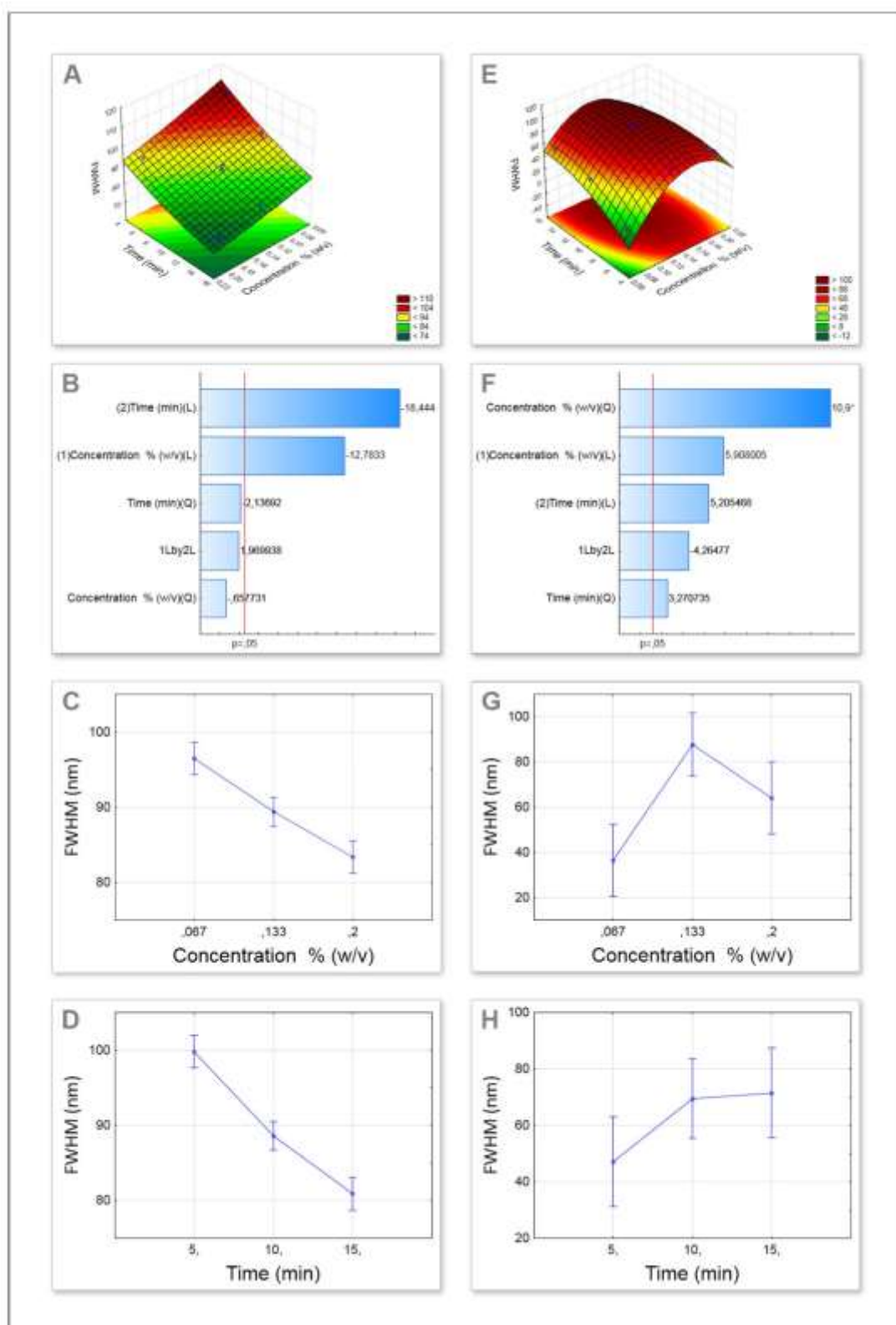


Figure 6. Three-dimensional response surface plot for bandwidth values at half height for Cit-AuNPs and BH-AuNPs by the influence of time and concentration (A and E). Pareto's chart representing the effects values from ANOVA for relative impact of concentration and time on Cit-AuNPs (B) and BH-NPs (F). Time and concentration influence on Cit-AuNPs (C and D) and BH-AuNPs (G and H).

Figure 6(C) shows the decrease of FWHM when the citrate concentration is increased. Previous studies have demonstrated that high citrate concentration allows stabilization of smaller particles, whereas in lower concentrations the coating process is somehow incomplete. As a result, non-uniform and polydisperse nanoparticles. The larger is citrate concentration, the faster is reached the supersaturation condition. This state generates a large number of nuclei, and subsequently a significant decrease in particle size [6,29,30].

In contrast, BH-AuNPs initially presents an inverse relationship of concentration levels with FWHM when compared to Cit-AuNPs for both concentration and synthesis time. Figure 6(G) and 6(H) show the FWHM against the reducing agent concentration and synthesis time, respectively. However, the initial trend is then reversed, when using either high concentration of reducing agent or synthesis time. The nanoparticles growth with borohydride is faster and yet less stable, promoting the formation of a large number of nuclei. A slight increase in the width of the absorption band was noted when synthesis time was increased (Fig. 6(H)). The BH-AuNP's have more discoid shapes and a wider size distribution, probably the borohydride not acting as a stabilizer as citrate molecules, which can lead to heterogeneous optical properties identified by the presence of large extinction bands.

In order to confirm the findings from our statistical analysis of FWHM, a particle counting analysis of from TEM images were performed with an average number of 500 nanoparticles per sample. Again, the agent concentration and synthesis time are the parameters under analysis, using the same set of values in Fig. 6. The fixed parameter is kept the middle of the range.

As can be seen in Fig. 7(A), the citrate elevation promoted a gradual increase in the uniformity of the diameters, seen in the reduced variance of histograms. This indicates the desired mono-dispersion effect. However, in the same experiments conducted with borohydride, the opposite behavior is initially observed; confirming in Fig. 7(B) the inferred polydisperse nanoparticles through broader FWHM measurements in Fig. 6(C). Even the effect of variance reduction in particle counting for the highest concentration in Fig. 7(B) could be captured in our inferred analysis seen in Fig. 6(G).

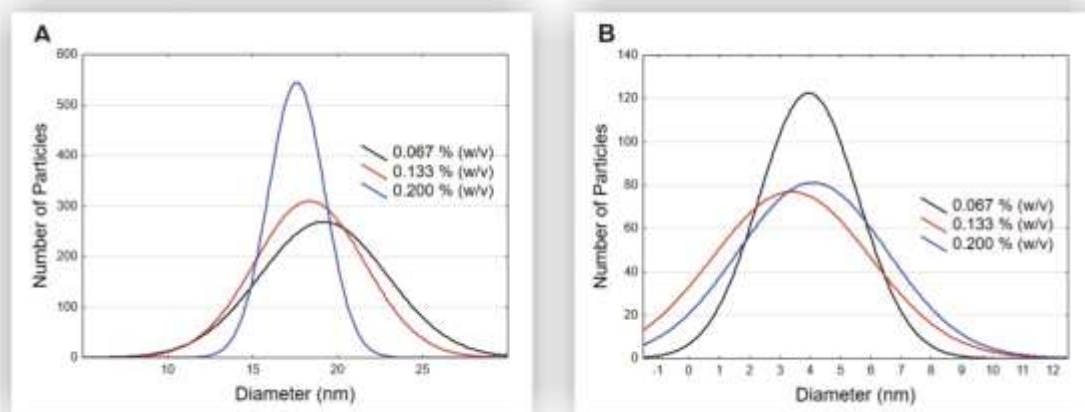


Figure 7 – Multiple histograms in same plot shows the effect of concentration in size distribution of AuNPs with synthesis time fixed at 10 minutes. Cit-AuNPs (A) and BH-AuNPs (B).

Finally, particle counting for different synthesis time is shown in Fig. 8 with intermediate concentrations of both reducing agents. Citrate ions have two functions: generation and stabilization of gold nanoparticles, so it is clear in Fig. 8(A) the change in the profile for samples from longer synthesis. For synthesis with borohydride, in Fig. 8(B), it was observed a lower dependence the size of nanostructures in relation to synthesis time.

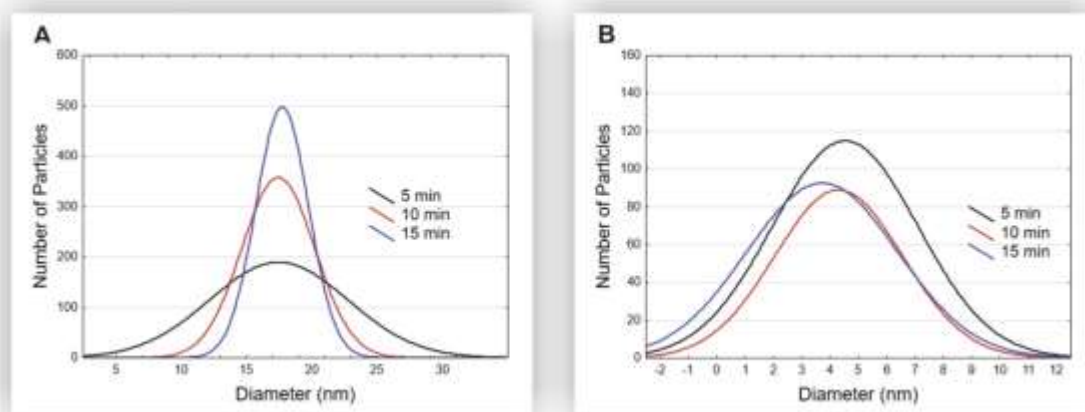


Figure 8 – Multiple histograms in same plot shows the effect of time synthesis in size distribution of AuNPs with concentration fixed at 0.133 % (w/v). Cit-AuNP's (A) and BH-AuNP's (B).

Once more, both histograms for Cit-AuNPs and BH-AuNPs in Fig. 8 bear close connections with the correspondent trends in Fig. 6. Thus, this verification with TEM supports the FWHM approach to synthesize nanoparticles with controlled monodispersity.

4. CONCLUSIONS

We investigated a facile method to synthesize Cit-AuNP's and BH-AuNP's with factorial design 3^2 based on FWHM measurements. The experimental results are in good agreement with predicted values. The current study reveals the potential application of RSM in optimizing the physical parameters. The findings has the potential to pave way for simple process design to offer large scale production of monodisperse gold nanoparticles without the need of complex and expensive image-based techniques.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Brazilian Ministry of Science and Technology (CNPq Grant 483036/2011-0). The Ministry of Science and Technology (MCTI/FINEP/CT-INFRA grant PROINFRA 01/2006) and Foundation Support Research and Innovation of Espírito Santo (Grant 006/2014). The

authors would like to acknowledge the Laboratory of Biomolecular Analysis (LABIOM) at Universidade Federal do Espírito Santo, for providing the equipment and technical support for experiments involving UV-Vis. We are also very grateful to Catherine Thorpe for kindly revise the manuscript.

6. REFERENCES

1. Peng G, Tisch U, Adams O, Hakim M, Shehada N, Broza YY, Bilan S, Abdah-Bortnyak R, Kuten A, Haick H. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotech.* 2009; 4: 669-73.
2. Terentyuk, GS, Maslyakova, GN, Suleymanova LV, Khlebtsov NG, Khlebtsov BN, Akchurin GG, Maksimova IL, Tuchin, VV. Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: toward cancer phototherapy. *J. Biomed Opt.* 2009; 14: 1-9.
3. Stuchinskaya T, Moreno M, Cook MJ, Edwards DR, Russell DA. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011;10: 822-31.
4. Zargar B, Hatamie A. A simple and fast colorimetric method for detection of hydrazine in water samples based on formation of gold nanoparticles as a colorimetric probe. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2013;182: 706-10.
5. Zhou Y, Dong H, Liu L, Li M, Xiao K, Xu M. Selective and sensitive colorimetric sensor of mercury (II) based on gold nanoparticles and 4-mercaptophenylboronic acid. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2014; 196: 106-11.
6. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B.* 2006;110: 15700-07.
7. Shahriari E, Yunus WMM, Saion E. Effect of particle size on nonlinear refractive index of Au nanoparticle in PVA solution. *Braz. J. Phys.* 2010;40: 256-60.
8. Radich JG, Kamat PV. Making graphene holey. Gold-nanoparticle-mediated hydroxyl radical attack on reduced graphene oxide. *ACS Nano.* 2013; 7: 5546-57.
9. Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir.* 2001; 17: 6782-86.
10. Sau TK, Pal A, Jana NR, Wang ZL, Pal T. Size controlled synthesis of gold nanoparticles using photochemically prepared seed particles. *J. Nanopart. Res.* 2001; 3: 257-61.
11. Kuo CH, Chiang T, Chen L, Huang MH. Synthesis of highly faceted pentagonal- and hexagonal-shaped gold nanoparticles with controlled sizes by sodium dodecyl sulfate. *Langmuir.* 2004; 20: 7820-24.
12. Patungsawa W, Hodak JH. pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction Mater. *Chem. Phys.* 2008; 108: 45-54.

13. Cooray MCD, Liu Y, Langford SJ, Bond AM, Zhang J. One pot synthesis of poly(5-hydroxyl-1,4-naphthoquinone) stabilized gold nanoparticles using the monomer as the reducing agent for nonenzymatic electrochemical detection of glucose. *Anal. Chim. Acta.* 2015; 856: 27–34.
14. Leiva A, Bonarredd S, Pino M, Saldías C, Kortaberria G, Radic D. Improving the performance of chitosan in the synthesis and stabilization of gold nanoparticles. *Eur. Polym. J.* 2015; 68: 419–431.
15. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier JA. Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* 1951; 11: 55–75.
16. Wuithschick M, Birnbaum A, Witte S, Sztucki M, Vainio U, Pinna N, Rademann K, Emmerling F, Kraehnert R, Polte J. Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. *ACS Nano.* 2015; 9: 7052–71.
17. Martínez, JC, Chequer NA, González JL, Cordova T. Alternative Methodology for Gold Nanoparticles Diameter Characterization Using PCA Technique and UV-VIS Spectrophotometry. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2012; 2: 184–9.
18. Wolfgang H., Nguyen T. K., Thanh J. A., David G. F. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.* 2007; 79: 4215–4221.
19. Nikhil RJ, Latha G, Catherine JM. Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir.* 2001; 17: 6782–6786.
20. Kenneth RB, Daniel GW., Michael JN. Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape. *Chem. Mater.* 2000; 12: 306–313.
21. Mathialagan T, Viraraghavan T. Biosorption of pentachlorophenol by fungal biomass from aqueous solutions: a factorial design analysis. *Environ. Technol.* 2005; 6: 571–579.
22. Ponnusami V, Krithika V, Madhuran R, Srivastava SN. Biosorption of reactive dye using acid-treated rice husk: factorial design analysis. *J. Hazard. Mater.* 2007; 142: 397–403.
23. Zolgharnein J, Shahmoradi A, Sangi MR. Optimization of Pb (II) biosorption by Robinia tree leaves using statistical design of experiments. *Talanta.* 2008; 76: 528–532.
24. Kaushik P, Malik A. Process optimization for efficient dye removal by *Aspergillus lentulus* FJ172995. *J. Hazard. Mater.* 2011; 185: 837–843.
25. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.* 2007; 79: 4215–21.
26. El-Brollosy TA, Abdallah T, Mohamed MB, Abdallah S, Easawi K, Negm S. Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique. *The European Physical Journal Special Topics.* 2008; 153: 361–364.
27. Brust M, Walker M, Bethell D. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system. *J Chem Soc Chem Comm.* 1994; 7:801–802.
28. Brust M, Fink J, Bethell D. Synthesis and reactions of functionalized gold nanoparticles. *J Chem Soc Chem Comm.* 1995; 21:1655–1656.
29. Than NTK, Maclean N, Mahiddine S. Mechanisms Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem. Rev.* 2014; 114: 7610–7630.
30. Mullin JW. *Crystallization*; Fourth ed.; London: University College London; 2001.

Artigo II

Uso da Microscopia Eletrônica de Transmissão Convencional para o estudo do espaçamento entre partículas utilizando diferentes ligantes

Resumo

O uso de nanomateriais com superfície modificada tem sido cada vez mais relatado numa infinidade de aplicações nas áreas de materiais, química, e principalmente biológica. No entanto, a interface metal-ligante esbarra na dificuldade de caracterização em prol da superfície química. A falta de metodologias analíticas tornou-se um obstáculo que nos impede de realizar modificações químicas bem-sucedidas da superfície de nanomateriais. Aqui, nós relatamos um método simples, utilizando a microscopia eletrônica de transmissão convencional para determinação da espessura da esfera de coordenação dos ligantes utilizados na modificação dos nanomateriais. Nossos resultados viabilizam o uso de um protocolo simples e confiável, e abrem novas perspectivas para o design controlado de nanomateriais com superfície modificada utilizando MET convencional para caracterização.

1. INTRODUÇÃO

O espaçamento utilizando alquil-ligantes na interface de nanomateriais, proporciona um controle preciso sobre as distâncias entre as AuNP's que vão desde angstroms até alguns nanômetros a depender do comprimento da cadeia do ligante. Alternativamente, polímeros e biomoléculas podem ser usados como espaçadores de maior comprimento para ajustar as distâncias entre nanopartículas [1-4]. A espessura da camada de ligantes está relacionada diretamente com a estabilidade do coloide e é fundamental para estudos de conjugação com biomoléculas, acoplamento plasmônico [5-7], entrega de drogas [8-10] opsonização em células animais e resposta imune [11-13], entre outras aplicações [14-16].

Estudos dedicados ao desenvolvimento de nanomateriais com superfície modificada possuem ainda muitas limitações relacionadas aos métodos de caracterização [17-19]. A análise por Dynamic Light Scattering (DLS) está entre as técnicas mais utilizadas para o dimensionamento de partículas e embora tenha obtido grande aplicabilidade [20-23], ainda assim é geralmente considerado um método de baixa resolução [24], dado a hidratação provocada pelas camadas de ligantes em solução aquosa e pela absorção de contra-íons [25]. Além disso, para as nanopartículas que têm uma larga distribuição de tamanhos, é difícil determinar se esta variação é devido à conjugação molecular ou à agregação.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é um método largamente utilizado para determinação da forma e do tamanho das nanopartículas metálicas, sendo frequentemente utilizada para construir distribuições de tamanhos de nanomateriais para diferentes aplicações. No entanto, esta técnica é frequentemente afetada com questões relacionadas a artefatos, confiabilidade estatística e interpretação [26]. A etapa de secagem é inevitável durante a preparação da amostra e pode resultar na deposição de partículas não uniformes e sua agregação [27]. Dada esta dificuldade, o estudo de monocamadas sobre superfícies metálicas por MET convencional é particularmente desafiador.

O estudo da espessura da esfera de coordenação de nanomateriais utilizando somente imagens obtidas por MET ainda não foi evidenciado na literatura como um método quantitativo. Assim, este trabalho discute os mecanismos que afetam o preparo de grades

para MET, estabelecendo um método simples e eficaz para estudar a influência das propriedades de distância das monocamadas em nanomateriais. Nossos resultados viabilizam o uso de um protocolo confiável utilizando MET convencional, e abrem novas perspectivas para a caracterização de nanomateriais com superfície modificada.

2. EXPERIMENTAL

2.1 REAGENTES E INSTRUMENTOS

Para a síntese de AuNP's utilizou-se o Ácido Tetracloroáurico (G4022) e Citrato Trissódico (PHR1416). Para as etapas de funcionalização foram utilizados o 16-Ácido Mercaptohexadecanóico (448303), 11-Ácido Mercaptoundecanóico (447528) e Ácido Mercaptopropiônico (M5801). Todos estes reagentes utilizados foram de pureza analítica e adquiridos pela Sigma Aldrich. Para limpeza das vidrarias foi utilizada água régia (HCl 3: 1 HNO₃) preparada a fresco e usada dentro de 1 hora. A água ultrapura utilizada para todos os ensaios e preparos de solução foi obtida pelo sistema de ultrapurificação EASYpure II® Thermo Scientific. O microscópio eletrônico de transmissão utilizado foi um JEOL 120 KV modelo JEM1400, utilizando filamento de hexaboreto de lantânio. A validação do método proposto foi realizada utilizando um equipamento de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (NPA152 Zetatrac, Microtrac Instruments, York, US).

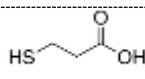
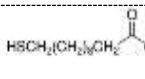
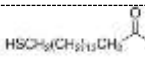
2.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AuNP's

A síntese foi realizada de acordo com a otimização para controle de tamanho já descrito por nosso grupo [28]. Resumidamente, 15 mL de HAuCl₄ a $2,5 \times 10^{-4}$ M reagiu com 1mL de citrato de sódio 1% por 15 minutos a 100°C. Após este tempo, o coloide foi resfriado em banho de gelo e depois submetido à centrifugação. Três lavagens foram realizadas para remoção das substâncias que não reagiram.

2.3 AUTO-MONTAGEM DE LIGANTES-TIOL

Os espaçadores utilizados neste estudo foram o Ácido Mercaptopropanóico (MPA), Ácido Mercaptoundecanóico (MUA) e Ácido Mercaptohexadecanóico (MHA), com cadeia de 3, 11 e 16 átomos de carbono respectivamente entre o grupo COOH e SH. Para a funcionalização das AuNP's, 100 μ L de cada um dos ligantes (10 mM) preparados em etanol foram adicionados a 1 mL de solução de nanopartículas de ouro durante 100h à temperatura ambiente (25°C). Uma amostra sem os ligantes foi utilizada para servir de controle. Uma visão geral sobre os ligantes utilizados é dado na Tabela 1. As nanopartículas modificadas foram lavadas 3 \times por centrifugação (8.608 g rpm, 20 min, MiniSpin, Eppendorf) e ressuspensas em água ultrapura.

Tabela 1. Dados dos ligantes utilizados como espaçadores para reações de acoplamento.

Ligante (espaçador)	Sigla	Estrutura Química	Fórmula Molecular	MM (g/mol)	Tamanho da cadeia*	Comprimento (nm)**
Sem ligantes	S/L	-	-	-	0	0
Ácido Mercaptopropiônico	MPA		$\text{HSC}_2\text{H}_4\text{COOH}$	106,14	3	0,66
Ácido Mercaptoundecanóico	MUA		$\text{HSC}_{10}\text{H}_{20}\text{COOH}$	218,36	11	0,84
Ácido Mecaptohexadecanóico	MHA		$\text{HSC}_{15}\text{H}_{30}\text{COOH}$	288,49	16	0,92

*O tamanho do ligante foi determinado pelo número de átomos de carbono na cadeia entre o átomo de enxofre e o ácido carboxílico. ** O comprimento (nm) foi determinado por uma única molécula no vácuo com a configuração de cadeia mais alongada, obtidas com o mínimo de energia utilizando o programa online calctool.org/calc/chem.

2.4 PREPARO DA AMOSTRA PARA MET

Para o preparo de amostras de suspensões coloidais para microscopia eletrônica de transmissão (MET), normalmente uma pequena gota de suspensão coloidal é pipetada sobre uma grade (100-400 mesh) de níquel ou cobre. Estas grades são previamente cobertas com *Formvar* (Resina termoplástica a base de PVA), e são deixadas para secar a temperatura ambiente (25°C). Durante a desidratação da amostra podem aparecer agregações que prejudicarão a análise da distribuição das partículas [29-31] e consequentemente o estudo do espaçamento provocado pelos ligantes nas AuNP's. A fim

de evitar estes inconvenientes durante a preparação das grades, as suspensões coloidais foram preparadas levando em conta os mecanismos que afetam o processo de secagem. Assim, 300 μL do coloide metálico foram colocados em uma lâmina de vidro previamente limpa e seca. O material foi deixado em repouso até a formação de um alo na borda da gota (efeito anel de café). Após esta etapa, a grade previamente coberta com polímero formvar foi colocada sobre a gota (E); A grade é arrastada cuidadosamente sobre todo o anel formado para recuperar o máximo possível de AuNP's (F). Detalhes sobre este procedimento podem ser visualizados na Figura 1.

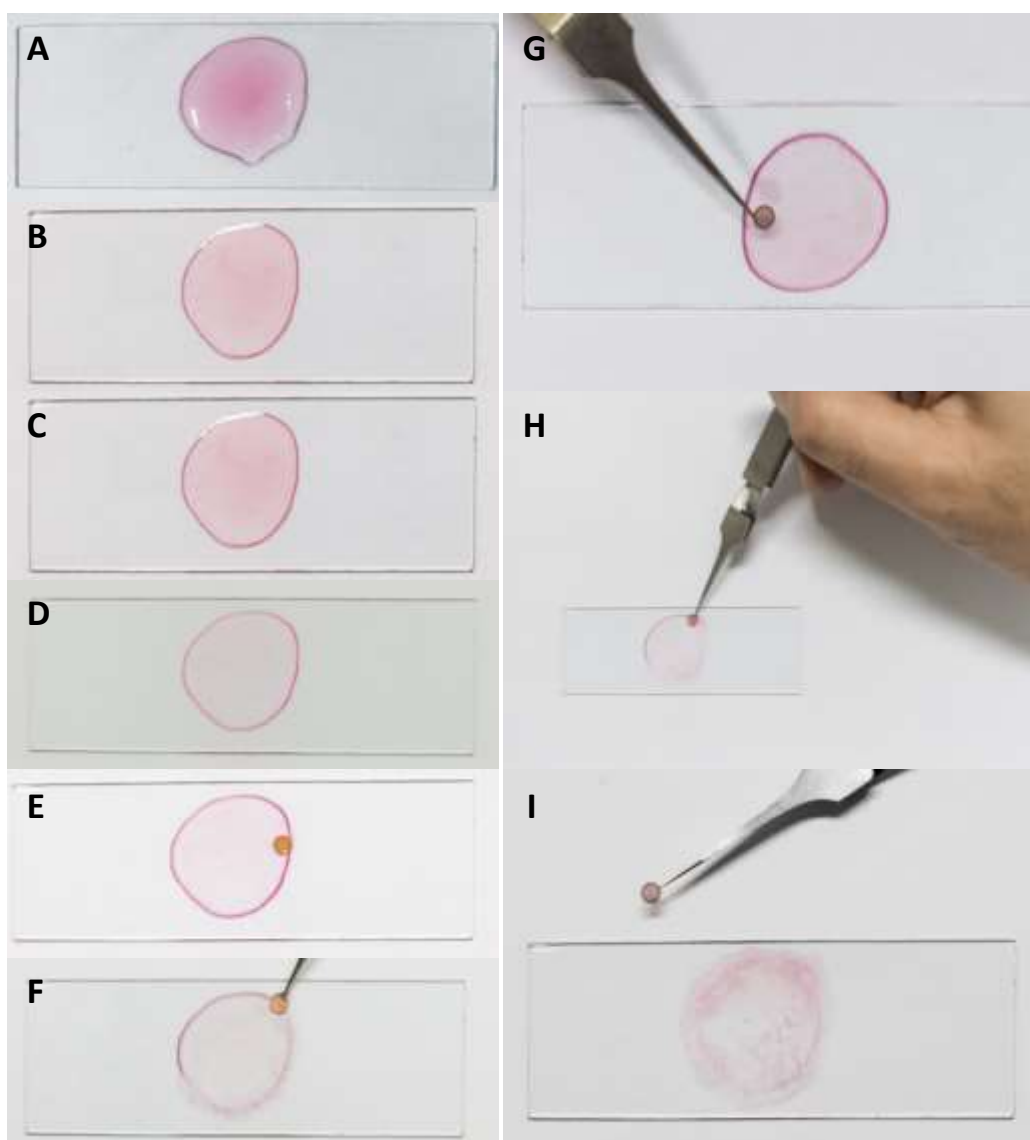


Figura 1. Imagens mostrando a sequência de como as grades foram preparadas. Primeiro passo é demonstrado em A, onde a suspensão coloidal de AuNP's foi gotejada no centro de uma lamina de vidro histológica; após um tempo de repouso, verifica-se a formação do anel de café nas bordas da gota (B-D); uma grade previamente coberta com polímero hidrofóbico formvar é colocada sobre a gota (E); A grade é arrastada cuidadosamente sobre todo o anel formado para recuperar o máximo possível de AuNP's (F). Detalhes do arraste da grade sobre a borda formada podem ser visualizados nas imagens G-I.

2.5 DETERMINAÇÃO DO ESPAÇAMENTO

Para o cálculo do espaçamento entre as partículas foram utilizados os diferentes alquil-ligantes como espaçadores (MPA, MUA e MHA) conforme detalhado na Tabela 1. O software livre da Digital Micrograph versão 2.31.734.0 (Gatan Inc.) foi utilizado para determinação da distância. A fim de evitar uma quantificação tendenciosa, o espaçamento entre 500 partículas foi avaliado para cada espaçador utilizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PREPARO DA AMOSTRA PARA MET

As interações coloidais têm efeito sobre a estabilidade dos coloides e interferem no processo de secagem na preparação das grades para microscopia eletrônica, assim como a evaporação do solvente pode favorecer uma distribuição não homogênea da amostra [32]. A Figura 2 apresenta os mecanismos que controlam este efeito. Resumidamente, a hidrofobicidade da superfície influencia a morfologia das gotículas durante o processo de evaporação do solvente, visto que em uma superfície hidrofóbica, um ângulo de contato constante (θ) será mantido com a diminuição da área de contato. Na superfície hidrofílica, uma área de contato constante será mantida com uma diminuição do ângulo de contato [33]. Além disso, as taxas diferenciadas de evaporação induzem um fluxo capilar a partir do centro da gota em relação a sua borda, resultando num transporte de líquido de material disperso para a borda da gota, este efeito é conhecido como efeito anel de café [27]. Outro efeito que também tem influência nesse processo é conhecido com fluxo de Marangoni, onde estabelece que a tensão superficial seja maior na região polar (central) da gota e menor próximo as bordas. Este gradiente é a fonte de uma recirculação de fluxo interno dirigido. Na prática, o fluxo de Marangoni é fraco em gotículas de água [27,34].

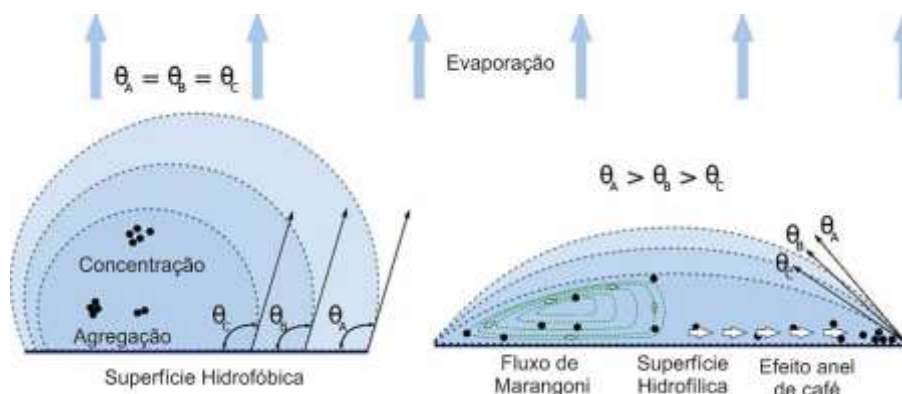


Figura 2. Esquema do mecanismo que afeta o processo de secagem. Duas forças capilares estão ativas: o efeito do anel de café transporta coloides para fora enquanto o fluxo de Marangoni neutraliza esse efeito. Na prática, o efeito do anel de café é superior em soluções aquosas. Todas as forças capilares são independentes do substrato.

Como pode ser observado, uma gota em evaporação é um sistema complexo, de difícil controle, em que uma multiplicidade de forças podem favorecer a deposição e agregação não uniforme. Quando uma gota do coloide é colocada sobre a grade, há uma grande formação de agregados e artefatos provocados principalmente pelo efeito anel de café. Quando a grade é preparada conforme o protocolo proposto nesse trabalho, há uma diminuição dos artefatos, favorecendo desta forma a quantificação das partículas. Além do mais, o preparo da amostra passando a grade sobre a borda da gota com uma alta concentração de partículas aumenta a concentração de partículas por área na grade, provocando um efeito de ‘saturação’ de partículas na grade e desta forma evidenciado o espaçamento entre as partículas.

3.2 DETERMINAÇÃO DO ESPAÇAMENTO

Com a desidratação do material sobre uma grade de microscopia eletrônica, as nanopartículas metálicas apresentam um espaçamento que está relacionado à espessura da esfera de coordenação formada durante a funcionalização. É esperado que após a total remoção de água do sistema, será possível calcular a distância das NP's com superfície modificada por imagens de MET convencional. Com base nisso, um método foi elaborado para determinação da distância do espaçamento entre as NP's. A Figura 3 abaixo mostra um esquema detalhando o princípio do método proposto. É interessante destacar que uma técnica semelhante é aplicada no processo de determinação de raio atômico por difratometria de raio-x, sendo assim possível determinar o raio atômico de um átomo

considerando a distância entre dois átomos iguais, sendo o raio determinado pela metade da distância encontrada. No presente caso o espaçamento foi calculado de uma forma mais precisa, pois a organização das partículas nas imagens de MET possibilitaram a aplicação do método proposto.

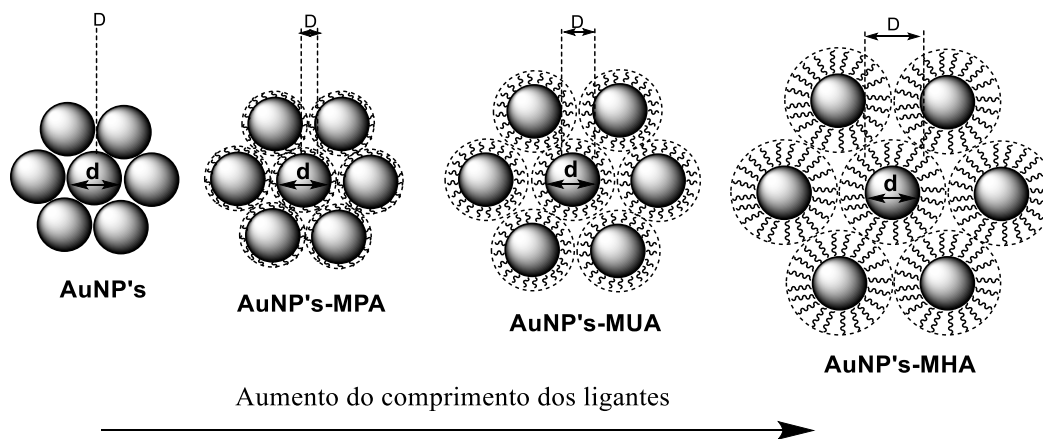


Figura 3. Ilustração esquemática mostrando o diâmetro da partícula (d) e a distância entre os núcleos metálicos (D) promovida pela espessura da esfera de coordenação à medida que aumenta o comprimento do ligante; Da esquerda pra direita: AuNP's sem ligantes; AuNP's – MPA com espaçamento de 3 carbonos; AuNP's – MUA com espaçamento de 11 carbonos e AuNP's-MHA com espaçamento de 16 carbonos.

A grande quantidade de nanopartículas usadas nesse procedimento tem como objetivo aumentar a confiabilidade da metodologia, sendo obtida uma média de espaçamentos entre os valores encontrados. Maiores detalhes sobre esta determinação podem ser encontrados no material suplementar. A Figura 4 ilustra algumas orientações estabelecidas para os cálculos realizados.

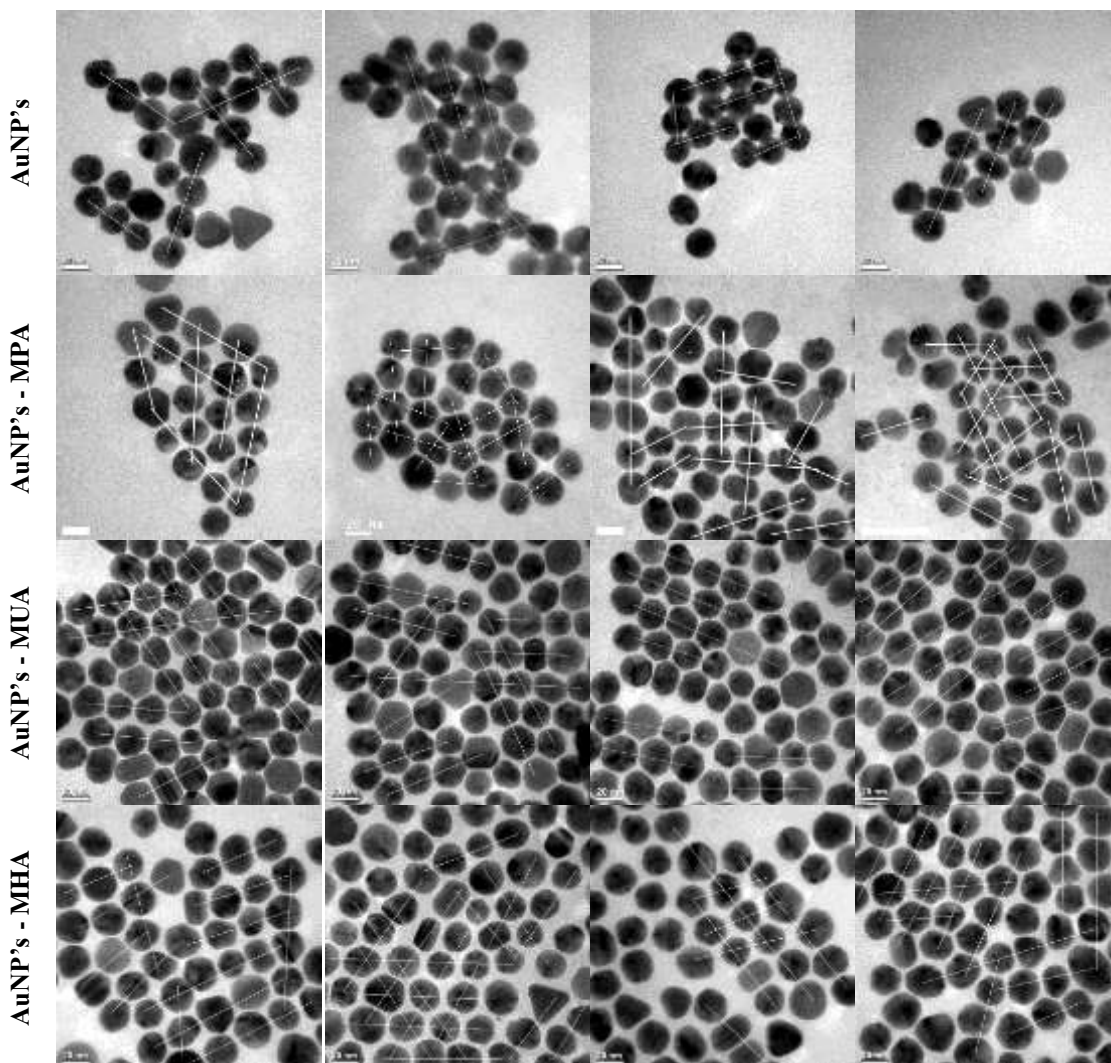


Figura 4. Exemplos de imagens de AuNP's (sem ligantes), AuNP's com ácido mercaptopropiônico (AuNP's-MPA), AuNP's com ácido mercaptoundecanóico (AuNP's-MUA) e AuNP's com ácido mercaptohexadecanóico (AuNP's-MHA), obtidas por microscopia eletrônica de transmissão utilizadas para a determinação do espaçamento entre as partículas.

A Figura 5 apresenta um exemplo da determinação do espaçamento pelo software. Os histogramas apresentados são oriundos da linha branca assinalada como exemplo em cada imagem de MET correspondente. É fácil observar que há uma relação direta do espaçamento entre as nanopartículas com o aumento do tamanho da cadeia dos compostos usados como espaçadores. Deve ser destacado que a esfera de coordenação apresenta compostos em diferentes orientações espaciais e juntamente com a morfologia regular das NP's promovem uma distribuição de espaçamentos favorecendo a aplicação deste método.

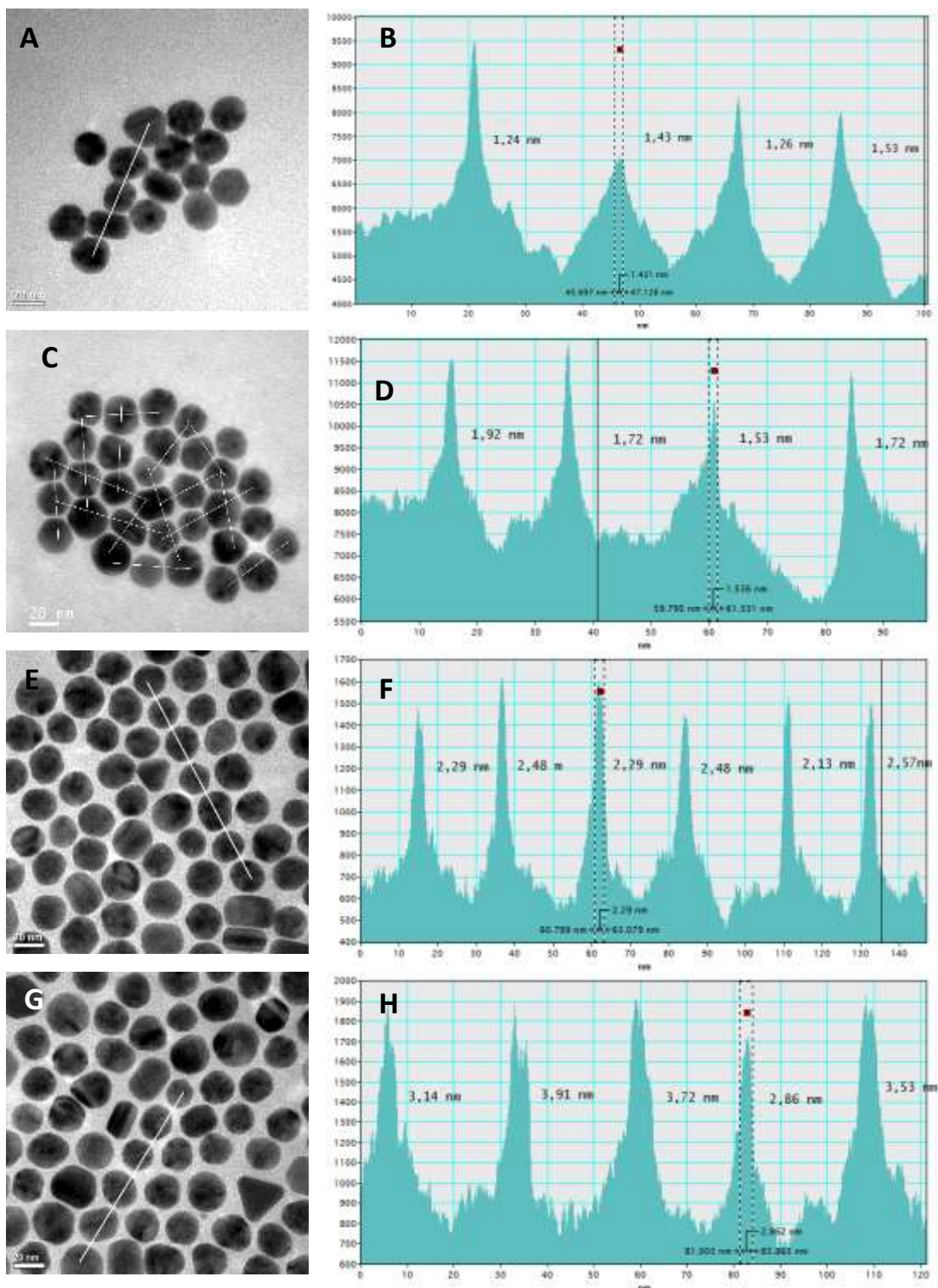


Figura 5. Exemplos de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão para determinação do espaçamento entre as partículas utilizando o software Digital Micrograph. AuNP's sem ligantes (A), AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptopropanoico (AuNP's-MPA) (C), AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptoundecanoico (AuNP's-MUA) (E), AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptohexadecanoico (AuNP's-MHA) (G); A linha branca mostra a demarcação onde os dados de espaçamento foram obtidos em cada imagem. Histogramas mostrando o espaçamento regular entre as partículas para todos os ensaios na ordem correspondente (B,D,F,H).

A Figura 6A condensa as informações apresentadas na Figura 5, fazendo uma comparação entre os espaçamentos obtidos para cada espaçador utilizado em um histograma gaussiano sobreposto. Também é apresentado na Fig 6B os valores de espaçamentos em nanômetros com os respectivos desvios para cada tratamento.

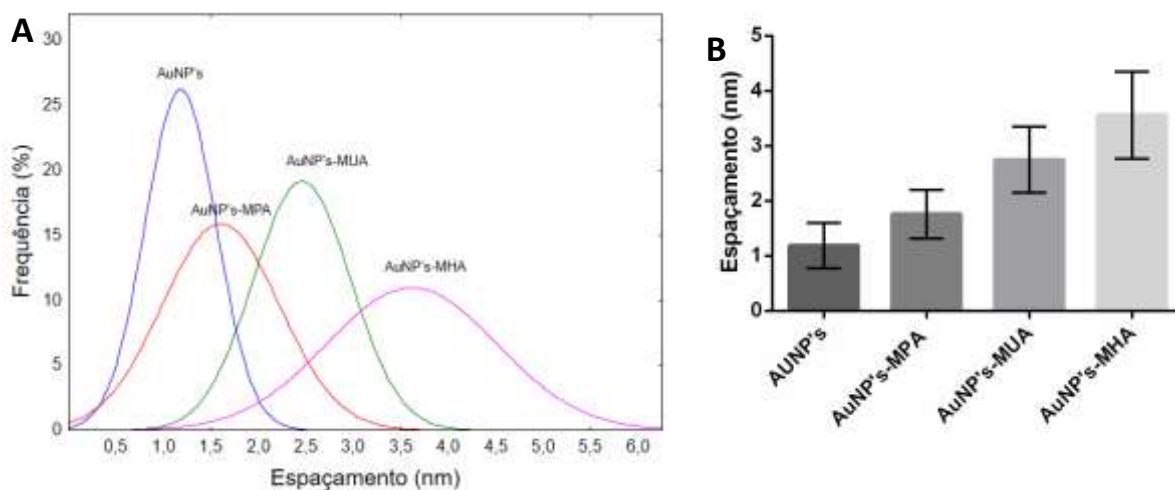


Figura 6. Histograma mostrando o espaçamento entre as nanopartículas de ouro funcionalizadas com diferentes espaçadores utilizados (A); Gráfico mostrando os desvios encontrados para cada espaçador (B), ácido mercaptopropiônico (MPA), ácido mercaptoundecanóico (MUA) e ácido mercaptohexadecanóico (MHA) e nanopartículas de ouro sem ligantes (AuNP's).

A dependência em nanômetros da monocamada formada em relação ao comprimento da cadeia dos ligantes também foi estudada em detalhe. A Tabela 2, lista os valores da espessura da esfera de coordenação, considerando a distância entre duas nanopartículas, sendo a espessura determinada pela metade da distância encontrada antes e após modificação com os espaçadores utilizados. A dependência da espessura (nm) em função do comprimento da cadeia (X) dos ligantes é ilustrado na Figura 7. Uma vez que o grupo tiol (SH) é igual para todos os espaçadores utilizados na quimiossorção Au-S, a dependência linear da espessura da monocamada pode ser atribuída ao aumento do comprimento da cadeia. A regressão obtida evidencia um aumento da monocamada de aproximadamente 0,08 nm para cada átomo de carbono do espaçador utilizado.

Tabela 2. Dados da espessura da monocamada de AuNP's modificadas com mercaptocarboxílicos de vários comprimentos de cadeia.

Sigla do Ligante	Nome do Ligante	C _x	Espaçamento (nm)	Espessura da monocamada (nm) *
Sem Ligante	Sem Ligante	0	1,1894	0,5947
MPA	ÁcidoMercaptopropiônico	C3	1,7597	0,8798
MUA	ÁcidoMercaptoundecanóico	C11	2,7478	1,3739
MHA	ÁcidoHexadecanóico	C16	3,5601	1,7800

* A espessura foi determinada pela metade da distância encontrada da média de 500 nanopartículas de ouro para cada espaçador utilizado.

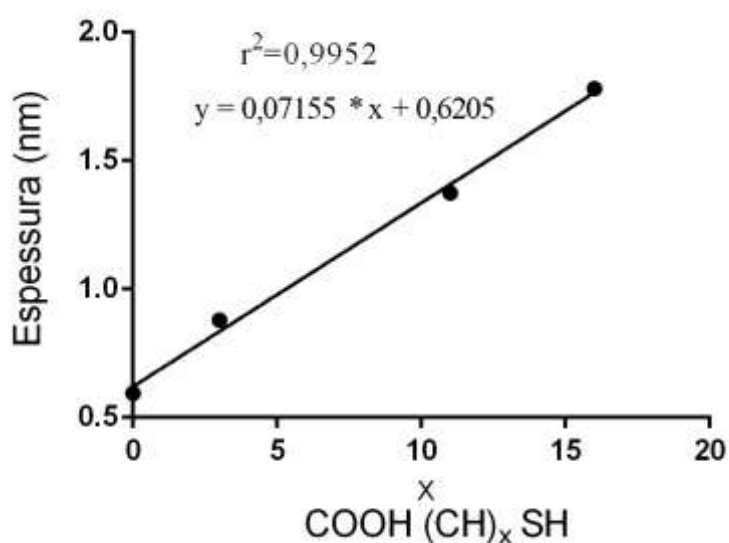


Figura 7. Dependência do comprimento da cadeia na espessura da esfera de coordenação promovida pelos diferentes comprimentos de cadeia dos ligantes mercaptocarboxílicos utilizados.

Para validar o método proposto, as amostras foram avaliadas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) que é a técnica normalmente utilizada para o estudo de nanomateriais com superfície modificada. A figura 8 apresenta os resultados encontrados e através desses resultados verificou-se que o tamanho hidrodinâmico médio aumentou na medida em que aumentava o comprimento da cadeia carbônica dos ligantes, evidenciando ligações bem-sucedidas e homogêneas dos ligantes. Para a amostra com o espaçador de menor comprimento (MPA) foi observado uma leve aglomeração da amostra. A Tabela 3 apresenta os resultados do diâmetro hidrodinâmico médio e a carga da superfície (Potencial Zeta).

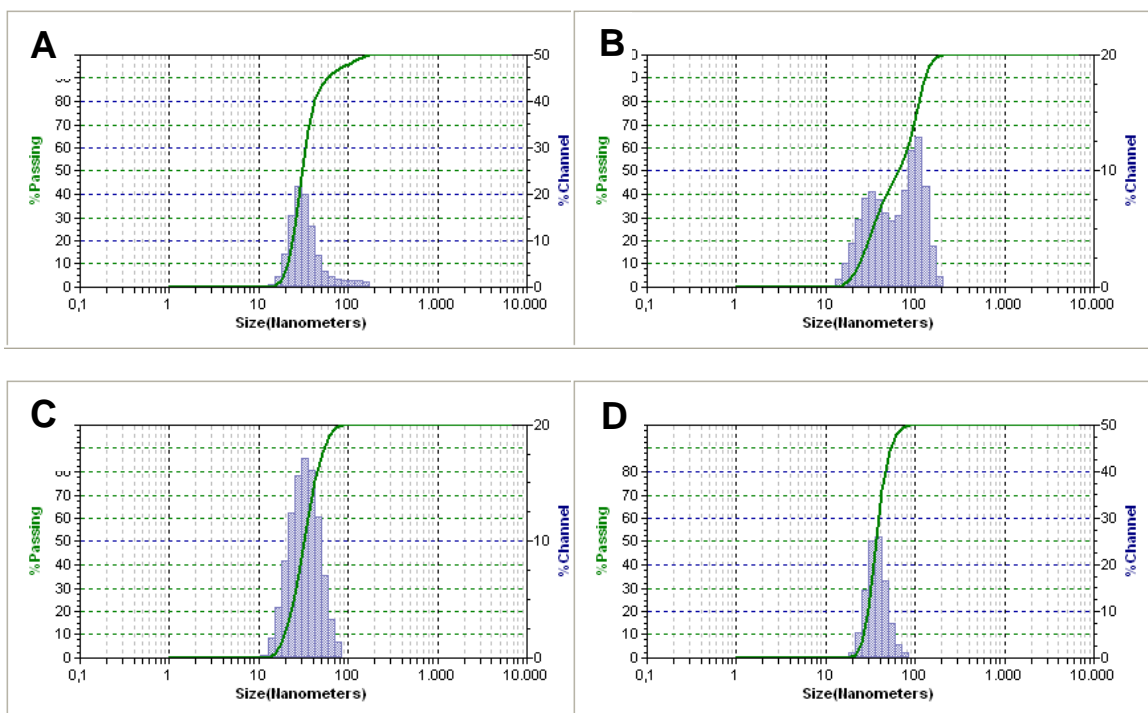


Figure 8. Histograma de distribuição de nanopartículas de ouro com diferentes ligantes utilizados. No eixo das abcissas temos os tamanhos das nanopartículas (em nm) e no eixo das ordenadas, temos a porcentagem (Frequência relativa) de partículas que situam nas respectivas faixas de tamanho. AuNP's (A); AuNP's - MPA (B); AuNP's – MUA (C); AuNP's – MHA (D).

O volume hidrodinâmico das nanopartículas no coloide aumenta quanto maior for sua interação entre a cadeia e o solvente. Esse fato é interessante visto que a cadeia carbônica apresenta pouca capacidade de interação com as moléculas de água devido sua baixa polaridade. No entanto, a interação é fortalecida pelo grupo carboxílico terminal quando este interage com as esferas de hidratação fornecida pela água. Tais características podem ser observadas na tabela 3, onde mostra os diferentes diâmetros obtidos nesse experimento. Os dados do potencial zeta mostraram uma alteração na presença de agentes carregados ao redor das nanopartículas nos diferentes ambientes. Quando apenas coordenada pelos íons de citrato, que manifestam uma característica iônica muito superior aos demais ligantes, maior foi o potencial obtido. As AuNP's com os ligantes apresentaram uma menor agregação de íons, obviamente devido à sua menor característica iônica, porém não é possível fazer uma correlação direta entre a cadeia do ligante usado com a carga observada no potencial zeta, já que a cadeia carbônica sofre a influência do efeito de coordenação, fato que altera sua capacidade de acomodação de íons.

Tabela 3. Valores referentes ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas com e sem ligantes obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e valores da medição da carga de superfície obtidas pelo potencial zeta.

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Potencial Zeta (mV)
AuNP's	31,00	+ 104,10
AuNP's – MPA	32,50 / 101,00	+ 44,98
AuNP's – MUA	32,70	+ 92,42
AuNP's – MHA	37,10	+ 64,19

Por fim, a tabela 4 abaixo resume os resultados obtidos para as técnicas já estabelecidas (DLS e predição teórica) juntamente com os dados obtidos por MET, objeto de estudo deste trabalho. Os resultados apontam que o método proposto é uma alternativa interessante para o estudo de nanomateriais com superfície modificada e abrem novos caminhos para o estudo desta interface. É interessante destacar que cada técnica usada apresenta sua particularidade e capacidade de ver a nanopartícula de uma determinada forma, portanto a comparação realizada e apresentada na tabela abaixo apenas tenta mostrar que diferentes técnicas apresentam a variabilidade equivalente na determinação da esfera de coordenação das nanopartículas quando coordenadas por diferentes ligantes. No MET verifica apenas o contorno das nanopartículas devido sua extensão metálica, não verificando nenhum tipo de agregado iônico que a mesma possa apresentar. Já o DLS pelo espalhamento de luz e devido às sensíveis alterações nos índices de refração no entorno das nanopartículas, consegue estimar o seu volume considerando sua esfera de coordenação e sua carga iônica que estabiliza as nanopartículas no meio.

Tabela 4. Comparação entre a espessura da esfera de coordenação determinada por diferentes técnicas.

Ligante	Espessura da esfera de coordenação (nm)		
	Cálculo Teórico*	DLS	MET
MPA	0,66	1,5	0,88
MUA	0,84	1,7	1,37
MHA	0,92	6,1	1,78

* O comprimento (nm) foi determinado por uma única molécula no vácuo com a configuração de cadeia mais alongada, obtidas com o mínimo de energia utilizando o programa online calctool.org/calc/chem

4. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi apresentado um protocolo simples e confiável utilizando MET convencional para o estudo da espessura da monocamada de nanomateriais de superfície modificada. Um método de preparo da grade para MET também foi discutido levando em conta a influência dos mecanismos de secagem para uma melhor qualidade dos resultados. Por fim, nossos dados foram comparados com a técnica de DLS e com os valores preditos por um programa computacional. Nossos resultados abrem novas perspectivas para estudo da funcionalização de nanomateriais com tamanhos de cadeia diversos utilizando MET convencional para quantificação, subsidiando o estudo de tais nanomateriais com superfície modificada para uma infinidade de aplicações.

5. REFERÊNCIAS

1. Florian Schulz, Tobias Vossmeier*, Neus G. Bastús, and Horst Weller. *Langmuir*, 2013, 29 (31), pp 9897–9908. DOI: 10.1021/la401956c
2. Zhang, G.; Yang, Z.; Lu, W.; Zhang, R.; Huang, Q.; Tian, M.; Li, L.; Liang, D.; Li, C. Influence of Anchoring Ligands and Particle Size on the Colloidal Stability and in Vivo Biodistribution of Polyethylene Glycol-Coated Gold Nanoparticles in Tumor-Xenografted Mice *Biomaterials* 2009, 30, 1928–1936
3. Manson, J.; Kumar, D.; Meenan, B.; Dixon, D. Polyethylene Glycol Functionalized Gold Nanoparticles: The Influence of Capping Density on Stability in Various Media *Gold Bull.* 2011, 44, 99–105
4. Mei, B. C.; Oh, E.; Susumu, K.; Farrell, D.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. Effects of Ligand Coordination Number and Surface Curvature on the Stability of Gold Nanoparticles in Aqueous Solutions *Langmuir* 2009, 25, 10604–10611
5. Jorge Zuloaga, Emil Prodan and Peter Nordlander*. *Nano Lett.*, 2009, pp.887-891. DOI: 10.1021/nl803811g.
6. Jorge Zuloaga, Emil Prodan and Peter Nordlander. *ACS Nano*, 4 (2010), pp. 5269–5276. DOI: 10.1021/nn202074v
7. Ruben Esteban, Andrei G. Borisov, Peter Nordlander, Javier Aizpurua. *Nat. Commun.*, 3 (2012), p. 825. DOI: 10.1038/ncomms1806
8. Sarah D. Brown, Paola Nativo, Jo-Ann Smith, David Stirling, Paul R. Edwards, Balaji Venugopal, David J. Flint, Jane A. Plumb, Duncan Graham, and Nial J. Wheate. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, pp. 4678–4684. DOI: 10.1021/ja908117a

9. Erik C. Dreaden, Sandra C. Mwakwari, Quaovi H. Sodji, Adegboyega K. Oyelere and Mostafa A. El-Sayed. *Bioconjugate Chem.* 2009, 20, pp.2247– 2253. DOI: 10.1021/bc9002212
10. Feng Wang, Yu-Cai Wang, Shuang Dou, Meng-Hua Xiong, Tian-Meng Sun, Jun Wang. *ACS Nano*, 2011, 5(5), pp.3679– 3692. DOI: 10.1021/nn200007z
11. Ajay S. Karakoti, Soumen Das, Suntharampillai Thevuthasan, Sudipta Seal. *Angew Chem., Int. Ed. Engl.*, 2011, 50(9), pp.1980– 1994. DOI: 10.1002/anie.201002969
12. Nikolai Khlebtsov, Lev Dykman. *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40(3), pp.1647– 167. DOI: 10.1039/c0cs00018c
13. Ralph A. Sperling, Eudald Casals, Joan Comenge, Neus G. Bastús, Victor F. Puntes. *Curr. Drug Metab.*, 2009, 10(8), pp.895– 904. DOI: 10.2174/138920009790274577
14. Florian Schulz, Gregor T. Dahl, Stephanie Besztejan, Martin A. Schroer, Felix Lehmkuhler, Gerhard Grübel, Tobias Vossmeier and Holger Lange. *Langmuir*, 2016. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01704
15. R. A. Sperling and W. J. Parak. *Philosophical Transactions of The Royal Society A*, 2010, 368, pp.1333-1383. DOI: 10.1098/rsta.2009.0273
16. Liu, Y.; Shipton, M. K.; Ryan, J.; Kaufman, E. D.; Franzen, S.; Feldheim, D. L. *Synthesis, Stability, and Cellular Internalization of Gold Nanoparticles Containing Mixed Peptide–Poly(ethylene glycol) Monolayers* *Anal. Chem.* 2007, 79, 2221– 2229
17. Timothy A. Larson, Pratixa P. Joshi, Konstantin Sokolov. *ACS Nano*, 2012, 6(10), pp.9182– 9190. DOI: 10.1021/nn3035155
18. Lisa Maus, Oliver Dick, Hilmar Bading, Joachim P. Spatz, Roberto Fiammengo. *ACS Nano*, 2010, 4(11), pp.6617– 6628. DOI: 10.1021/nn101867w
19. Carrie A. Simpson, Amanda C. Agrawal, Andzerj Balinski, Kellen M. Harkness, David E. Cliffel. *ACS Nano*, 2011, 5(5), pp.3577–3584. DOI: 10.1021/nn103148x
20. Robert I. MacCuspie, Andrew J. Allen, Vincent A. Hackley. *Nanotoxicology*, 2010, 5(2). DOI: 10.3109/17435390.2010.504311
21. Leonard F. Pease III, De-Hao Tsai, Rebecca A. Zangmeister, Michael R. Zachariah, Michael J. Tarlov. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111 (46) pp.17155– 17157. DOI: 10.1021/jp075571t
22. D-H. Tsai, R. A. Zangmeister, L. F. Pease III, M. J. Tarlov, M. R. Zachariah. *Langmuir*, 2008, 24 (16), pp.8483– 8490. DOI: 10.1021/la7024846
23. De-Hao Tsai, Frank W. Delrio, Robert I. MacCuspie, Tae Joon Cho, Michael R. Zachariah, Vincent A. Hackley. *Langmuir*, 2010, 26(12), pp.10325– 10333. DOI: 10.1021/la100484a
24. Robert Wilson, Yang Chen, Jenny Aveyard. *Chem. Commun. (Camb.)*, 2004, pp. 1156–1157. DOI: 10.1039/b402786h
25. Pilar Rivera-Gil, Dorleta Jimenez de Aberasturi, Verena Wulf, Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Yuanyuan Zhao, Jesus M. de la Fuente, Idoia Ruiz de Larramendi, Teófilo Rojo, Xing-Jie Liang, Wolfgang J. Parak. *Acc. Chem. Res.*, 2013, 46(3), pp. 743–749. DOI: 10.1021/ar300039j
26. Hall, J. B., Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K. & McNeil, S. E. *Characterization of nanoparticles for therapeutics*. *Nanomedicine* 2, 789–803 (2007).

27. Robert D. Deegan, Olga Bakajin, Todd F. Dupont, Greg Huber, Sidney R. Nagel, Thomas A. Witten. *Nature*, 1997, 389, pp.827-829. DOI: 10.1038/39827
28. Dados não publicados (Ver artigo I desta tese)
29. Dieckmann, Y., Colfen, H., Hofmann, H. & Petri-Fink, A. Particle Size Distribution Measurements of Manganese-Doped ZnS Nanoparticles. *Anal. Chem.* 81, 3889–3895 (2009).
30. Domingos, R. F. et al. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7277–7284 (2009).
31. Bell, N. C., Minelli, C., Tompkins, J., Stevens, M. M. & Shard, A. G. Emerging Techniques for Submicrometer Particle Sizing Applied to Stöber Silica. *Langmuir* 28, 10860–10872 (2012).
32. Benjamin Michen, Christoph Geers, Dimitri Vanhecke, Carola Endes, Barbara Rothen-Rutishauser, Sandor Balog, Alke Petri-Fink. Avoiding drying-artifacts in transmission electron microscopy: Characterizing the size and colloidal state of nanoparticles. *Scientific Reports*. 2015; 5 : 9793. DOI: 10.1038/srep09793
33. Picknett R. G. and Bexon, R. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1977, 61(2), pp.336-350. DOI: 10.1016/0021-9797(77)90396-4
34. Hua Hu and Ronald G. Larson. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110(14), pp.7090-7094. DOI: 10.1021/jp0609232

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Valores correspondentes ao espaçamento de 500 nanopartículas de ouro (AuNP's) sem a utilização de ligantes obtidos pelo software Digital Micrograph.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1,7	1,2	1,5	0,9	1,6	1,2	1,3	0,6	0,9	1,3	1,4	1,1	1,5	1,3	1,7	1,2	1,5	0,9	1,6	1,2
2	1,5	1,3	1,1	0,8	0,9	1,3	0,8	1,5	1,5	0,8	1,2	0,7	0,6	0,7	1,5	1,3	1,1	0,8	0,9	1,3
3	0,7	0,9	1,1	1,4	1,4	1,4	1,5	1,5	1,9	1,4	1,4	1,9	1,3	0,9	0,7	0,9	1,1	1,4	1,4	1,4
4	1,4	0,8	0,6	0,7	0,7	1,1	1,7	1,7	1	0,7	0,8	1,1	1,1	1,9	1,4	0,8	0,6	0,7	0,7	1,1
5	1	1	0,8	0,6	0,3	1,4	1,4	1,5	1,2	1,4	1,9	1,4	1,2	0,8	1	1	0,8	0,6	0,3	1,4
6	0,7	0,9	0,9	0,5	1,5	1,4	1,4	1,7	1,5	1,4	1,4	1,9	1,9	2,9	0,7	0,9	0,9	0,5	1,5	1,4
7	1,6	1,2	1,7	1,5	0,7	0,8	0,4	0,6	1,7	1	1	1	1	1,6	1,6	1,2	1,7	1,5	0,7	0,8
8	1,7	1,4	1,4	1,6	1	1	1,4	1,5	2	1	1,9	0,6	0,5	0,8	1,7	1,4	1,4	1,6	1	1
9	0,9	0,8	1	1,1	0,7	1	0,7	1	1,2	1	2,3	1,8	1,3	1,2	0,9	0,8	1	1,1	0,7	1
10	1,2	0,9	1,2	0,8	1,3	0,8	1,3	0,8	1,3	1,5	1,5	2	1,9	1,8	1,2	0,9	1,2	0,8	1,3	0,8
11	1,5	0,8	0,7	0,3	0,7	1,2	1,1	1,4	0,7	2,3	0,6	1,1	1,2	1,1,2	1,5	0,8	0,7	0,3	0,7	1,2
12	1,9	0,8	0,9	0,9	1,1	1,4	1,2	0,9	1,2	1,4	1,2	1	1,1	0,6	1,9	0,8	0,9	0,9	1,1	1,4
13	0,8	0,7	1,2	1,2	1,4	1,6	1,2	1,27	1,07	1,23	1,59	1,27	1,91	1,11	0,8	0,7	1,2	1,2	1,4	1,6
14	1,43	1,91	1,91	1,75	0,95	0,95	1,27	0,38	0,95	1,43	1,43	1,43	1,59	1,59	1,43	1,91	1,91	1,75	0,95	0,95
15	0,95	1,43	1,27	0,95	0,79	0,95	1,59	0,64	0,96	0,48	0,32	1,3	1,62	1,33	0,95	1,43	1,27	0,95	0,79	0,95
16	1,24	1,14	1,11	1,14	1,05	0,76	0,76	0,76	1,04	1,14	0,8	1,11	1,4	1,05	1,24	1,14	1,11	1,14	1,05	0,76
17	0,76	0,48	1,27	0,64	1,27	1,75	1,91	1,43	1,43	1,18					0,76	0,48	1,27	0,64	1,27	1,75
18	1,7	1,2	1,5	0,9	1,6	1,2	1,3	0,6	0,9	1,3	1,4	1,1	1,5	1,3	1,7	1,2	1,5	0,9	1,6	1,2
19	1,5	1,3	1,1	0,8	0,9	1,3	0,8	1,5	1,5	0,8	1,2	0,7	0,6	0,7	1,5	1,3	1,1	0,8	0,9	1,3
20	0,7	0,9	1,1	1,4	1,4	1,4	1,5	1,5	1,9	1,4	1,4	1,9	1,3	0,9	0,7	0,9	1,1	1,4	1,4	1,4
21	1,4	0,8	0,6	0,7	0,7	1,1	1,7	1,7	1	0,7	0,8	1,1	1,1	1,9	1,4	0,8	0,6	0,7	0,7	1,1
22	1	1	0,8	0,6	0,3	1,4	1,4	1,5	1,2	1,4	1,9	1,4	1,2	0,8	1	1	0,8	0,6	0,3	1,4
23	0,7	0,9	0,9	0,5	1,5	1,4	1,4	1,7	1,5	1,4	1,4	1,9	1,9	2,9	0,7	0,9	0,9	0,5	1,5	1,4
24	1,6	1,2	1,7	1,5	0,7	0,8	0,4	0,6	1,7	1	1	1	1	1,6	1,6	1,2	1,7	1,5	0,7	0,8
25	1,7	1,4	1,4	1,6	1	1	1,4	1,5	2	1	1,9	0,6	0,5	0,8	1,7	1,4	1,4	1,6	1	1

Média Final = 1,1894 nm

Tabela S2. Valores correspondentes ao espaçamento de 500 nanopartículas de ouro com o ligante ácido mercaptopropiônico (AuNP's-MPA) obtidos - software Digital Micrograph.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0,38	0,45	1,05	0,95	1,30	0,67	1,05	0,76	1,10	0,57	0,96	1,15	0,76	1,31	1,63	1,71	1,44	1,44	2	1,34
2	1,15	0,76	1,31	1,15	0,96	1	1,05	0,67	0,76	1,44	0,96	0,95	1,22	1,71	1,82	1,53	1,82	2,60	2,21	1,21
3	1,91	0,97	1,52	1,52	1,42	1,66	1,62	1,86	1,37	1,87	0,57	2,52	0,57	1	1,53	2,11	2,00	1,24	1,34	2,30
4	1,24	1,55	1,37	0,52	1,43	0,96	0,76	2,39	2,91	1,52	2,34	1,62	1,84	2,67	2,11	1,97	1,44	1,72	1,82	1,34
5	1,21	2,10	1,43	1,90	2	1,34	1,81	2,39	2,39	2,58	2,34	2,34	1,40	2,30	1,42	1,12	1,45	1,80	1,32	2,00
6	2,20	2	1,80	2,50	2,30	1,40	1,80	1,90	1,80	2,21	1,63	1,54	1,72	1,73	1,72	1,85	1,92	1,79	1,80	1,15
7	1,34	1,86	2,02	2,20	1,15	1,44	0,87	1,24	1,32	1,45	2,30	2,40	1,63	2,42	1,92	1,80	1,82	1,72	1,72	1,24
8	2,32	2,30	2,10	1,92	2,30	1,80	2,22	1,72	2,32	2,59	2,20	2,30	2,38	1,72	1,91	2,59	2,10	1,72	2,59	2,30
9	1,86	1,95	2,40	1,44	1,63	2,20	2,78	1,78	1,65	1,92	2,11	1,22	2	1,63	1,73	1,63	1,63	1,63	1,72	2,90
10	1,72	1,34	1,72	1,62	1,72	2	2,40	1,24	1,72	1,34	1,53	1,65	2	1,20	1,46	1,63	2,11	1,62	1,63	2,11
11	1,82	2,40	2,59	2,20	2,49	1,72	1,96	1,81	1,63	0,96	1,72	0,95	1,44	1,15	1,44	1,34	1,63	2,59	1,82	1,82
12	2,11	1,82	1,92	1,53	1,63	1,63	1,83	2	1,65	2,30	2	2,30	2,11	2,40	1,44	1,68	2,30	1,80	1,60	1,58
13	2	2,30	2,30	2,40	2,40	2,68	2,87	2,22	2,49	1,97	1,97	1,72	1,43	2,59	2,34	1,15	1,82	2,00	2,26	2,30
14	1,59	1,47	1,87	1,95	1,34	1,35	1,44	1,15	1,72	1,44	1,48	2	2,11	2,13	1,24	1,15	1,44	1,92	1,57	1,63
15	2,49	2,30	1,72	2,49	1,82	2,49	1,53	1,72	1,85	2,11	2,49	1,88	1,68	2,30	2,40	2,30	1,80	1,59	2,00	1,86
16	2,11	1,63	1,78	1,96	1,22	1,53	1,97	2,13	1,49	1,44	1,78	1,52	1,52	1,34	1,44	1,82	2,21	2,21	1,63	1,44
17	1,35	1,59	1,63	2,11	1,24	2,30	1,44	1,63	1,24	1,63	1,63	1,62	1,58	1,63	1,84	1,72	1,82	1,96	1,25	1,24
18	1,44	1,15	1,34	1,35	2,30	1,91	2,50	1,82	1,44	1,72	2	1,56	1,63	1,53	2,11	1,97	2,59	2,39	2,16	2,42
19	2,41	2,59	2,40	1,44	1,72	1,69	1,63	1,24	1,53	1,53	1,52	1,53	1,78	1,79	1,72	1,86	1,94	1,95	1,40	1,42
20	1,33	1,78	1,25	1,44	1,24	1,63	1,34	1,05	1,15	2,11	1,92	1,44	1,63	2	1,89	1,53	2,11	2,11	2,20	1,74
21	1,72	1,63	1,82	1,24	1,82	2,11	2,49	2,11	2,01	1,95	1,98	1,76	1,78	2,35	1,63	2,30	2,00	1,91	1,72	1,34
22	1,53	1,92	1,92	1,82	1,96	1,45	1,63	1,78	1,67	1,82	2,59	1,53	1,45	1,63	1,86	1,43	2,00	2,30	1,63	0,96
23	1,53	1,82	1,44	2	2,10	2,40	2	2,11	1,72	1,46	1,43	1,72	1,92	1,05	2,40	2,30	1,92	2,53	1,65	2,30
24	1,56	1,52	1,54	1,43	1,96	1,15	2,11	1,71	2,21	1,44	1,34	1,63	2,40	1,30	1,34	1,53	1,89	1,92	2,49	1,97
25	2	1,88	2,01	2,01	1,82	1,56	1,65	1,94	1,59	1,54	1,99	1,24	1,25	1,72	1,15	1,56	2,15	2,20	1,72	1,44

Média Final = 1,7597 nm

Tabela S3. Valores correspondentes ao espaçamento de 500 nanopartículas de ouro com o ligante ácido mercaptoundecanóico (AuNP's-MUA) - software Digital Micrograph.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	2,24	2,4	1,8	1,8	2,19	2,33	2,43	1,9	1,5	1,59	1,91	3,34	2,01	2,48	3,1	2,7	3	3	3,6	2,5
2	2,9	2,43	2,48	2,2	2,62	2,48	2,95	2,62	1,86	2,33	1,95	1,43	1,52	1,57	2,5	3,3	3,5	2,8	2,3	2,8
3	2,14	1,86	2,24	1,52	1,35	1,76	1,9	2,86	2,9	2,38	2,23	2,39	2,39	2,7	3,9	3,8	2,2	3,5	3,8	3,5
4	1,91	2,39	2,54	2,23	2,54	2,7	2,39	2,55	2,39	2,89	2,55	2,23	2,71	2,39	2,4	2,3	2,3	2,1	2,4	3,7
5	2,71	2,39	2,71	2,71	2,71	3,18	2,38	2,95	2,86	3,02	2,2	2,7	2,39	3,34	3	3,2	2,7	3,6	2,4	3,8
6	2,86	2,54	2,39	2,97	2,07	1,91	1,75	1,91	2,23	2,39	3,02	2,55	3,02	3,66	1,86	1,36	2,48	2,14	3	2,7
7	2,07	3,02	2,86	3,02	2,39	2,55	2,86	2,54	2,54	2,86	2	2,87	2,39	3,18	3,02	1,75	2,07	2,39	1,93	1,75
8	2,07	2,87	2,71	3,18	3,02	3,2	2,23	2,86	2,7	2,44	2,86	2,86	3,18	2,39	2,71	3,02	3,34	2,55	2,07	2,55
9	3,02	3,02	2,38	2,86	3,66	2,55	3,5	2,86	3,2	2,86	3,66	3,34	2,7	3	3,8	2,23	2,02	2,39	1,75	1,71
10	3,18	2,55	2,86	2,55	2,39	3,19	2,7	2,29	2,29	2	2,8	2	1,9	1,9	2,23	1,71	2,07	2,5	2,7	1,75
11	3	2,9	2,43	3,33	3,19	2,52	2,52	2,5	1,8	3,2	2,4	2,52	3,15	2,8	1,91	2,39	2,07	3,02	2,7	2,07
12	2	3,2	2,24	2,29	2,38	3,2	2,4	2,7	3,57	3,72	3,8	3,6	3,34	3,9	2,5	3	3,4	3,2	3,2	3,5
13	3,4	3,4	3	2,5	2,5	1,9	4,1	4,1	3,5	3,5	3,5	3,2	3,2	3,5	3,2	3,3	3	3,7	3,2	3,2
14	2,3	2,8	2,4	2,4	2,8	2,1	2,1	2,1	2,1	2,2	2,4	2,4	2,9	2,7	4,2	4,1	2	2,3	2,4	2,9
15	2,6	3	2,8	3	3,3	3,2	3,4	2,9	3	3,2	3,2	3,9	3,4	3,7	3,4	3,8	3,8	2,8	2,1	2,3
16	3,6	3,6	2,6	3,2	3,4	3,3	3,4	3,3	3,3	2,3	4	3,4	2,6	2,8	3,2	3,2	3	2,6	3,4	3,2
17	2,4	2,6	3,5	2,4	2,3	2,2	2,3	3,1	2,8	3,8	2,6	3,2	3,3	3,3	2,7	2,86	2,23	2,54	2,7	1,91
18	2,8	3,7	3,1	2,7	2,7	1,9	3,4	3,9	3,6	3,4	3,4	3,5	3,9	3,2	2,23	2,07	3,34	2,54	1,91	1,91
19	3,3	3	2,8	3,5	3,3	3,8	2,4	2	2,7	2	2,2	2,7	2,4	2	3,02	3,34	2,7	2,23	2,07	2,54
20	1,7	2,4	2,1	2,1	2,2	2,1	2,8	2,4	2,7	2,7	3,2	2,8	2,8	2,4	1,91	2,7	2,07	2,39	1,91	2,55
21	2,4	1,9	1,9	3,5	3,3	3,5	2,4	2,3	2,3	2,8	3,2	2,7	2,4	2,4	2,23	1,75	1,59	2,23	2,23	2,7
22	3	3,3	3,5	2,8	3,3	3	3	2,7	3,3	2,7	2,8	3,2	3,2	3,4	2,5	3	3,4	3,2	3,2	3,5
23	3,4	3,3	3,5	3,9	3,5	3,6	3,9	2	2,4	2,4	2,1	3,9	3,5	3,2	3,5	3,3	1,9	2,7	2,07	1,91
24	2,9	3	4	3,5	4	3,5	4,2	3,8	2,1	2,4	2,2	2,5	3,2	3,9	3,1	3,9	1,79	2,91	2,54	2,38
25	3,9	3,6	3,3	3,4	2,7	2,7	2,4	2,6	2,3	3,5	3,3	2,4	2,8	3,2	2,3	1,9	2,23	3,19	1,91	3,34

Média Final = 2,7479 nm

Tabela S4. Valores correspondentes ao espaçamento de 500 nanopartículas de ouro com o ligante ácido mercaptohexadecanóico (AuNP's-MHA) - software Digital Micrograph.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	4,7	4,9	2,8	3	4,4	3,6	3,2	3,2	4,4	3,6	4,4	3,2	4,5	3	3	4,8	3,2	3,1	3,6	3,6
2	5	2,4	2,8	2,9	2,4	3	3,5	4,6	3,5	3,8	4,6	3,8	4,2	3,2	2,1	2,1	2,5	2,5	3,33	3,7
3	3,4	3,1	3,4	3,8	3,6	3,2	3,2	5,5	5,3	4,6	3,8	4,3	4,2	4,3	3,7	3,7	3,8	4,1	4	4,1
4	3,5	4	3,2	3,8	3,8	3,8	3,9	3,4	4	4,9	3,2	3,1	4,3	4,2	3,7	3,7	3,8	2,2	2	2,5
5	3,8	4,4	2,9	2,9	3,5	3,2	3,8	2,6	3,5	3,2	3,7	5,7	5,9	5,8	2,5	1,9	4,46	5,09	5,41	5,09
6	5,5	5,1	5,3	4,4	3,8	3,5	4,4	4,3	3,3	3,5	3,9	3,9	3,4	2,8	3,98	3,45	3,66	3,02	3,33	3,34
7	3,4	3,6	4,1	4,5	4,5	3,8	4,4	3,2	3,5	4,1	3,5	4,7	4,4	4,4	2,54	3,35	2,86	2,86	2,86	2,39
8	5,7	4,2	4,4	4,4	4,4	5,8	3,1	3,5	3,5	4,9	4,6	4,7	4,2	3,7	2,71	2,71	3,34	3,66	3,34	5,25
9	2,7	2,7	2,4	3,3	3,3	3,2	3	2,9	2,6	2,8	3,4	3,2	3,4	3,3	4,13	3,02	3,97	2,71	2,86	3,34
10	2,6	2,8	3,2	3,5	2,6	2,4	3,15	4,6	2,5	2,9	2,8	3,6	3,8	4,1	2,7	3,34	2,39	2,54	5,25	2,23
11	4,1	3,1	4,4	4,9	4	2,2	2,19	2,4	2,6	2,4	3,8	5	3,4	2,8	3,02	3,5	4,3	3,8	2,55	3,34
12	2,6	3,6	4,1	5,5	4,2	4,7	3,7	3,9	3,9	3,2	3,6	3,7	3,4	2,8	4,2	3,3	3	3,4	2,2	2,8
13	4,1	2,5	2,1	2,9	2,2	3,4	4,2	3	3	2,3	2,4	4,1	3	3,3	2,4	3	2,5	2,8	3,9	3
14	3,8	3,7	3,3	3,4	3,7	4,3	4,9	3,8	4,4	3,2	2,9	2,9	1,9	3,2	2,9	3,5	3,9	3,4	2,6	2,8
15	3,3	2,7	5,5	4,3	3,2	3,8	3,8	4,2	4,2	3,2	3,2	3,2	2,8	2,4	3	2,2	3	2,2	2,8	3,3
16	3,2	2,7	3	2,4	3,8	3	3,4	4	3,5	4,9	4,6	4,14	3,8	3,8	2,73	3,34	4,13	4,13	4,45	3,82
17	5	4,9	4,9	4,7	3,6	3,2	3,8	3	3,2	4	3,2	3,8	3,8	3,7	3,82	3,34	4,77	4,13	4,13	4,45
18	2,4	3	3,8	2,87	3,4	3,3	3,6	3	3,2	3	3,9	3,6	3,9	3,9	2,39	1,39	2,87	3,34	2,7	4,45
19	4,1	3,8	4,2	3,2	2,5	3,5	3,8	4,8	4,4	3,3	3,7	3,6	3,5	3,1	5,25	4,3	3,34	3,66	4,14	4,93
20	3,2	3,2	3,2	3,1	2,8	2,8	3	3	3,5	3,8	4,2	4,3	3,9	3,8	2,7	3,02	3,5	3,34	3,66	2,39
21	3,8	3,9	4,1	2,8	2,7	3,7	3	2,5	3,3	3,8	3,8	4,9	4,2	4,2	2,23	3,02	2,86	3,02	2,7	2,7
22	3,8	3,8	4,1	3,2	3	3,8	3,2	3,8	3,8	3,9	4,3	4,4	5,2	3,3	3,3	3,2	2,7	2,6	3,66	2,71
23	3,1	3,1	3	4,1	4,9	3,1	3,8	4,3	4,7	2,4	2,6	4,1	4,2	4,1	3,4	3,1	4,65	3,5	3,34	3,5
24	4,6	4,9	3,9	3,5	3,2	4,9	4,2	3,8	4,9	5,2	4,5	2,5	4,2	4,1	3,3	3,6	3,34	2,38	2,7	2,95
25	5,1	4,9	4,1	5,1	4,9	4,1	4,6	1,7	2	2,7	2,5	3	3,8	3,4	3,82	3,17	3,39	3,2	4	3,34

Média Final = 3,5601 nm

Artigo III

Nanopartículas de ouro com superfície modificada: efeito do comprimento do ligante na estabilidade coloidal e na interação com proteínas

Resumo

Nanomateriais com superfície modificada tem sido bem estabelecidos para o acoplamento de biomoléculas para uma infinidade de aplicações em nanobiotecnologia. Vários estudos têm levantado a hipótese de que a espessura da monocamada pode ser responsável por propriedades importantes, tais como eficiência de conjugação, solubilidade, reconhecimento celular, resposta imune e entrega de drogas. No entanto, poucos são os relatos que relacionam a espessura da camada no sucesso da bioconjugação e com a estabilidade desses sistemas. Neste trabalho nós investigamos minuciosamente o sucesso da funcionalização com monocamadas de ligantes mercaptocarboxílicos e a dependência da estabilidade desses nanoconjugados em diferentes condições. Além disso, otimizamos uma rota de bioconjugação utilizando proteína sérica bovina (BSA) como um modelo de proteína. Nossos resultados abrem novas perspectivas no entendimento da influência da espessura das monocamadas na geração de nanobioconjugados reprodutíveis e estáveis para diversas aplicações biológicas.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de biomoléculas com nanomateriais tem sido explorada por uma infinidade de aplicações em nanotecnologia [1-10] e tem colaborado sobremaneira para o desenvolvimento de plataformas para tecnologias de diagnósticos e terapias da próxima geração [11]. As proteínas são uma das classes mais importantes de agentes biológicos para serem combinados com nanomateriais e tem sido amplamente utilizada como modelo, visto que suas características estruturais fornecem uma série de opções para a modificação e conjugação. Para o estabelecimento de nanobioconjugados confiáveis e reprodutíveis, a compreensão desta interface (nano-bio) e o entendimento de como as nanopartículas (NP's) interagem e se comportam em sistemas biológicos são fundamentais [12,13].

Estudos tem evidenciado que o comprimento da cadeia do ligante determina as propriedades interfaciais [14,15], como a interação de partículas com as membranas celulares [16-18], a solubilidade e o reconhecimento molecular [19,20]. Além disso, há um consenso que a superfície química do ligante da partícula determina a maioria das propriedades relacionadas a esta interface [6]. Nanopartículas com superfície modificada são geralmente conhecidas como Monocamadas Auto Organizadas (SAMs, do inglês Self-Assembled Monolayers) [21]. Embora muitos trabalhos tenham reportado sobre o estudo de SAMs, poucas investigações incluíram uma abordagem biológica, levando em conta a estabilidade em diferentes condições de pH, força iônica e a influência do comprimento da cadeia dos ligantes na bioconjugação.

A conjugação com proteínas normalmente envolve o uso de SAMs, visto que a interação eletrostática apresenta várias deficiências como a necessidade de altas concentrações de proteína, orientação aleatória, desnaturação e uma fraca reprodutibilidade [21-23]. Para aplicações biológicas, o acoplamento covalente apresenta a vantagem de manter a estrutura terciária da proteína e de minimizar possíveis efeitos negativos sobre as propriedades após a conjugação [21,24]. O método mais utilizado e o mais popular envolve a utilização de um agente de ligação cruzada de comprimento zero, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e o NHS (N-Hidroxisuccinamida), para a formação de ligações amida entre grupos carboxílicos dos ligantes e as aminas primárias das proteínas [25]. Apesar de esta abordagem ser utilizada em um grande número de publicações como estratégia de ligação,

a maioria dos trabalhos não leva a uma compreensão abrangente das etapas de acoplamento na eficiência de conjugação [14,16-18,25].

Neste trabalho, nós investigamos a influência da espessura de monocamadas na estabilidade coloidal (pH e força iônica) e a influência do espaçamento na bioconjugação, utilizando a proteína sérica bovina (BSA) como modelo. UV-Vis, Plasma indutivamente acoplado a um espectrômetro de massas (ICP-MS), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x (EDS) e Difractometria de raios-x (XRD) foram utilizados para caracterização das AuNP's. DLS, Infra-vermelho (FTIR), Espalhamento Raman e MET foram utilizados para o estudo da formação das monocamadas e um parâmetro de floculação foi adotado para avaliar a estabilidade coloidal em diferentes condições. Uma otimização da bioconjugação foi realizada avaliando a razão molar EDC/NHS no acoplamento covalente e o rendimento dessa reação foi monitorado pela adsorção de BSA na superfície das nanopartículas pela fluorescência.

2. EXPERIMENTAL

2.1 REAGENTES

Para a síntese de AuNP's utilizou-se o Ácido Tetracloroáurico (G4022) e Citrato Trissódico (PHR1416). Para as etapas de funcionalização foram utilizados o 16-Ácido mercaptohexadecanóico (448303), 11-Ácido mercaptoundecanóico (447528), Ácido mercaptopropiônico (M5801), N-hidroxisuccinamida (NHS) (130672), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (E6383) e proteína sérica bovina (BSA) liofilizada (05470). Todos estes reagentes utilizados foram de pureza analítica e adquiridos pela Sigma Aldrich. Para higienização das vidrarias foi utilizada água régia (HCl 3: 1 HNO₃) preparada a fresco e usada dentro de 1 hora.

2.2 INSTRUMENTOS

As propriedades ópticas foram avaliadas por espectrofotometria de UV-vis (FEMTO 800 XI). O tamanho e morfologia das nanopartículas de ouro foram examinados por MET

utilizando um microscópio da JEOL, modelo JEM1400 operado a 120KV com filamento de hexaboreto de lantânio (LAB6). A composição elementar foi confirmada por Energia dispersiva de raios-x (EDS) usando detector Oxford Instruments X-max acoplado a um MEV da ZEISS modelo EVO MA10 operado a 30 kV com filamento de tungstênio. A natureza cristalina das AuNP's foi confirmada por difratometria de raios-x (DRX) usando o Difrátômetro D8 – ADVANCE (BRUKER – AXS). A concentração total de nanopartículas foi determinada usando plasma indutivamente acoplado a um espectrômetro de massas (ICP-MS) da Perkin Elmer modelo Optima 7000, USA. A confirmação da funcionalização dos ligantes foi investigada pela absorção na região do Infravermelho (FT-MIR FTLA 2000 Bomem), espectroscopia Raman (ALPHA 300R Raman Spectrometer), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (NPA152 Zetatrak, Microtrac Instruments, York, USA). O detector de fluorescência da Varioskan Flash (Thermo Scientific) foi utilizado para determinação das proteínas totais (excitação em 280 nm e com varredura da emissão de 300 a 500 nm). A centrífuga MiniSpin (Eppendorf) foi utilizada nas etapas de separação. A água ultrapura para todos os ensaios e preparos de solução foi obtida pelo sistema de ultrapurificação EASYpure II® Thermo Scientific.

2.3 SOFTWARES

O Origin Pro 8.5 versão livre e GraphPad Prism versão 6.01 foram utilizados para a elaboração dos gráficos de UV-Vis, IR e Raman, bem como para a análise estatística. O Software Chemdraw Prime (cortesia Perkin Elmer) foi utilizado para ilustração das estruturas químicas e o software Image J versão livre foi utilizado na quantificação da razão de aspecto das AuNP's nas imagens obtidas por MET.

2.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AuNP's

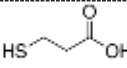

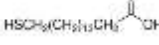
A síntese foi realizada de acordo otimização realizada para controle de tamanho anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa [26]. Resumidamente, 15 mL de HAuCl_4 a $2,5 \times 10^{-4}$ M reagiram por 15 minutos com 1mL de citrato de sódio 1% a 100°C sob refluxo. Após este tempo, o coloide foi resfriado em banho de gelo e depois submetido a centrifugação seguida por 3 lavagens para remoção das substâncias que não reagiram. A avaliação das condições ótimas (tempo x rotação) de centrifugação para evitar perda de

material foi realizada e pode ser verificada em detalhes no Material suplementar (Fig. S1e Tab. S1). O material foi então caracterizado por UV-Vis, MET, EDS e XRD e ICP-MS.

2.5 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE COM OS LIGANTES

Os espaçadores utilizados neste estudo foram o ácido mercaptopropanóico (MPA), ácido mercaptoundecanóico (MUA) e ácido mercaptohexadecanóico (MHA), com comprimento do espaçador de 3, 11 e 16 átomos de carbono respectivamente entre o grupo COOH e SH. Para a funcionalização das AuNP's, 100 μ L de 10 mM em etanol de cada um dos ligantes foram adicionados a 1 ml de solução de nanopartículas de ouro durante 100h a 800rpm em temperatura ambiente (25°C). Uma amostra sem os ligantes foi utilizada para servir de controle e avaliar as interações não covalentes com a proteína. Uma visão geral sobre os ligantes utilizados é dado na Tabela 1. As nanopartículas modificadas foram lavadas 3 \times por centrifugação (16.873 g, 20 min) sendo depois ressuspensas em água ultrapura. Para caracterização desta etapa o material foi caracterizado por UV-Vis, IR, Raman, MET, Potencial Zeta e DLS.

Tabela 1. Dados dos ligantes com grupamento tiol utilizados como espaçadores para reações de acoplamento.

Ligante (espaçador)	Sigla	Estrutura Química	Fórmula Molecular	PM (g/mol)	Tamanho *
Sem ligantes	S/L	-	-	-	0
Ácido Mercaptopropiônico	MPA		HSC ₂ H ₄ COOH	106,14	3
Ácido Mercaptoundecanóico	MUA		HSC ₁₀ H ₂₀ COOH	218,36	11
Ácido Mecaptohexadecanóico	MHA		HSC ₁₅ H ₃₀ COOH	288,49	16

*O comprimento do ligante foi determinado pelo número de átomos da cadeia carbônica entre os grupos SH e COOH terminal.

2.6 ACOPLAMENTO DE PROTEÍNAS (BSA)

Para os ensaios de bioconjugação foram utilizados os agentes de comprimento zero (*zero-length crosslinkers*), que são reagentes que promovem a ligação entre duas moléculas, sem formar um composto adicional entre os dois sistemas [12]. Dentre eles, os mais empregados em processos de bioconjugação são as carbodiimidias. Esses compostos

pertencem a uma classe de reagentes que são capazes de promover a ativação de grupamentos carboxilatos ou fosfatos, os quais podem interagir com aminas primárias presentes em inúmeros compostos de origem biológica. A estratégia adotada neste trabalho envolve o estudo do acoplamento covalente de proteínas na superfície das AuNP's, utilizando o emprego de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e o grupo intermediário estabilizador N-hidroxissuccinimida (NHS), amplamente conhecidos como protocolo EDC/NHS para reações de acoplamento de SAMs com biomoléculas [27,28].

A bioconjugação foi realizada mediante a otimização do método utilizando o EDC/NHS. Para ajustar a melhor condição de acoplamento, foram realizados ensaios com diferentes concentrações dos reagentes envolvidos utilizando as seguintes razões molares (EDC:NHS), 1:0, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3 e 1:4. Assim, foi adicionado em 100 µL das nanopartículas com a superfície modificada com os ligantes (MPA, MUA e MHA), 100 µL de EDC (aq.) por 30 minutos e em seguida adicionou-se 100 µL de uma solução aquosa de NHS (aq.) na proporção molar previamente estabelecida e deixou a mistura sob agitação orbital por 30 minutos a 150 rpm. Após este período 100 µL da proteína (BSA, 15µM) foi inserida no sistema deixando reagir por 30 minutos. A Albumina Sérica Bovina foi imobilizada através dos seus grupos amino, formando uma ligação amida com ácido carboxílico previamente ativado (EDC/NHS). Depois de decorrido o tempo necessário (30 min), a proteína não ligada foi removida por centrifugação e dosada por fluorescência. A quantidade de proteína ligada às nanopartículas foi calculada pela subtração da concentração inicial menos a proteína livre detectada no sobrenadante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AuNP's

AuNP's de tamanho controlado foram sintetizadas de acordo descrito na seção de metodologia utilizando o HAuCl₄ reduzido com o citrato de sódio. O coloide metálico foi caracterizado por UV-Vis, XRD, MET, EDS e ICP-MS. Os resultados podem ser verificados na Figura 1. A fim de determinar a forma predominante do coloide sintetizado, o cálculo para determinação da Razão de aspecto também é apresentado juntamente com o

histograma da contagem de 500 partículas nas imagens de MET realizadas pelo software Image J.

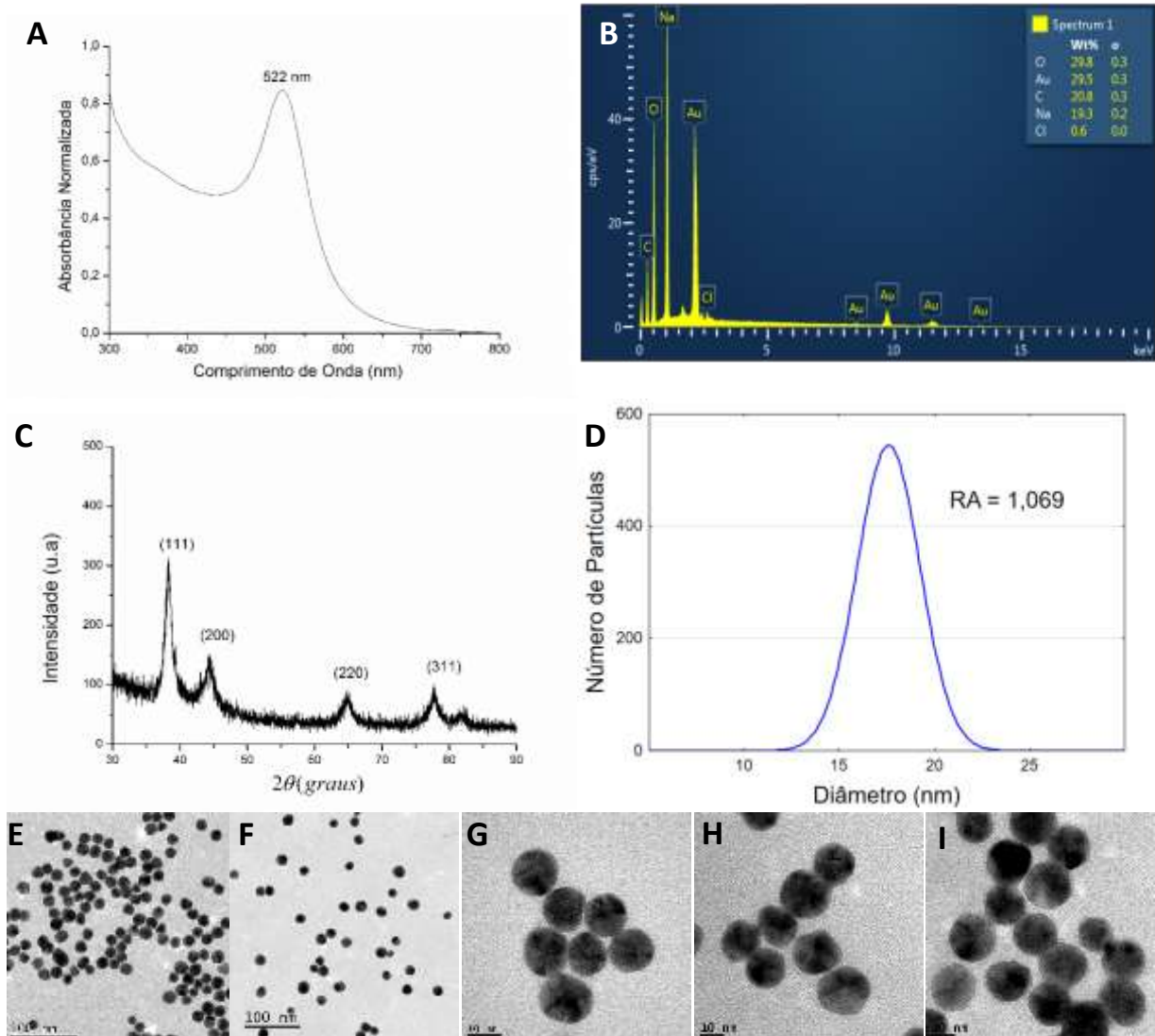


Figura 1. Espectroscopia de absorção UV-Visível para o colóide de ouro sintetizado mostrando o pico plasmônico característico em 522 nm (A); Composição elementar realizada por EDS (B); Padrão de difração de raios-x (C); Histograma mostrando a distribuição gaussiana de diâmetro e a razão de aspecto (RA) de 500 partículas obtidas por imagens feitas de microscopia eletrônica de transmissão (D); Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (E-I) em diferentes magnificações mostrando o tamanho e a distribuição das nanopartículas sintetizadas. Scale bar 100 nm (E e F) e 10 nm (G-I).

O pico plasmônico característico em 522 foi observado pela análise de UV-visível e a largura de banda estreita indica a monodispersividade das AuNP's sintetizadas, assim como no histograma de tamanhos obtidos com as imagens de MET. A característica esférica predominante também pode ser verificada nas imagens de MET juntamente com os dados da razão de aspecto (RA). A RA é calculada dividindo o diâmetro maior pelo diâmetro menor. Valores próximos de 1 indicam a esfericidade e valores mais elevados

indicam formas mais alongadas e não esféricas. O detalhamento do cálculo da razão de aspecto pode ser verificado no material suplementar (Fig. S2 e S3).

A natureza cristalina das AuNP's foi confirmada por análise de DRX. Os quatro picos de difração intensos foram observados a 2Θ , sendo os valores encontrados de $38,31^\circ$, $44,45^\circ$, $64,64^\circ$ e $77,73^\circ$, correspondente ao (111), (200), (220), e (311) de reflexão do ouro metálico cristalino, respectivamente. Um forte pico de difração (111) sugere que este padrão é a orientação predominante de AuNP's. A concentração foi determinada por ICP-MS e os resultados foram de 27,4 mg/L de Au.

3.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE COM OS LIGANTES

A funcionalização das AuNP's foi realizada com ligantes mercaptocarboxílicos, conforme Tabela 1 na seção de metodologia. O detalhe da ligação dativa envolvendo o grupamento tiol-ouro para este tipo de funcionalização pode ser visto na ilustração apresentada na Figura 2. AuNP's são estabilizadas por repulsão eletrostática dos íons carboxílicos do citrato carregados negativamente e adsorvidos na sua superfície. Esta camada pode ser facilmente substituída por ligantes com uma afinidade de ligação mais forte, tal como, por exemplo tióis [29,30]. Assim, num segundo passo, as moléculas de citrato foram substituídas pelos ligantes mercaptocarboxílicos (MPA, MUA e MHA). Esses ligantes dão acesso à novas medidas de funcionalização na periferia do ligante. Uma extremidade (SH) se liga à superfície e dá estabilidade à partícula enquanto a outra extremidade (COOH) está exposta à solução. Por um lado, uma nova ligação entre Au e S com alta afinidade é construída por transferência, assegurando uma substituição completa de citrato devido às fortes afinidades de ligação. Por outro lado, o ácido carboxílico livre pode servir como uma âncora para as outras reações de acoplamento com aminas. Além disso, a cadeia alquil longa proporciona flexibilidade suficiente para que a porção ativa possa interagir com o receptor multivalente [31].

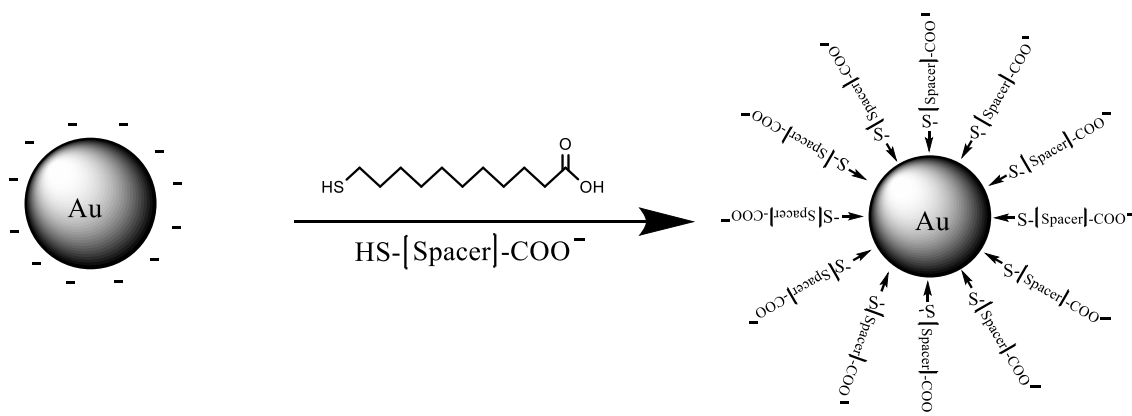


Figura 2. Esquema representativo mostrando a funcionalização de uma nanopartícula de ouro com um ligante mercaptocarboxílico, nesse caso, o ácido mercaptoundecanóico com grupos SH e COOH em cada uma das extremidades.

As informações físicas do fenômeno de coordenação dos ligantes podem ser entendidas e explicadas pelos diferentes tamanhos dos mesmos. Por esse motivo, técnicas tradicionais como a espectrometria da região do visível, consiste numa ferramenta importante para melhor compreender o sistema de coordenação com os diferentes ligantes. A espectroscopia de absorção óptica é uma técnica de fácil acesso e rotineiramente utilizada na análise de funcionalização de coloides metálicos. Isto porque há um ligeiro deslocamento do comprimento de onda para a direita no espectro, na medida em que as moléculas interagem com a superfície do metal. Esse deslocamento é consistente com modelos que preveem pequenos desvios da banda de absorção de plasmons de superfície sobre a formação de camadas dielétricas [29-32]. Particularmente em ambientes biológicos, ligantes tiolados são geralmente recomendados, uma vez que podem ficar estavelmente adsorvidos na superfície metálica por longos períodos [33], provavelmente devido à força da ligação Au-S e à elevada densidade de adsorção dos ligantes [34].

A Figura 3 apresenta o espectro de absorção do coloide de ouro sintetizado e funcionalizado com os três espaçadores conforme apresentado na Tabela 1. São notados desvios do pico de plasmons de superfície de 522-523nm para AuNP's-MPA, 522-525nm para AuNP's – MUA e 522-527nm para AuNP's-MHA. Tais alterações ocorrem devido o aumento da esfera de coordenação e a alteração na disponibilidade de carga dos ligantes selecionados. Deve-se destacar que todos os ligantes usados apresentam o átomo de enxofre como ponto de ligação com as nanopartículas de ouro. Desse modo, a extensão do ligante será o principal componente que modifica o efeito da ressonância de plasmons de

superfície localizada. Além dos desvios observados, pôde se verificar também que não houve agregação de partículas, pois o espectro de absorção não foi ampliado em comprimentos de onda próximos a região de 700 nm, indicando uma funcionalização bem-sucedida.

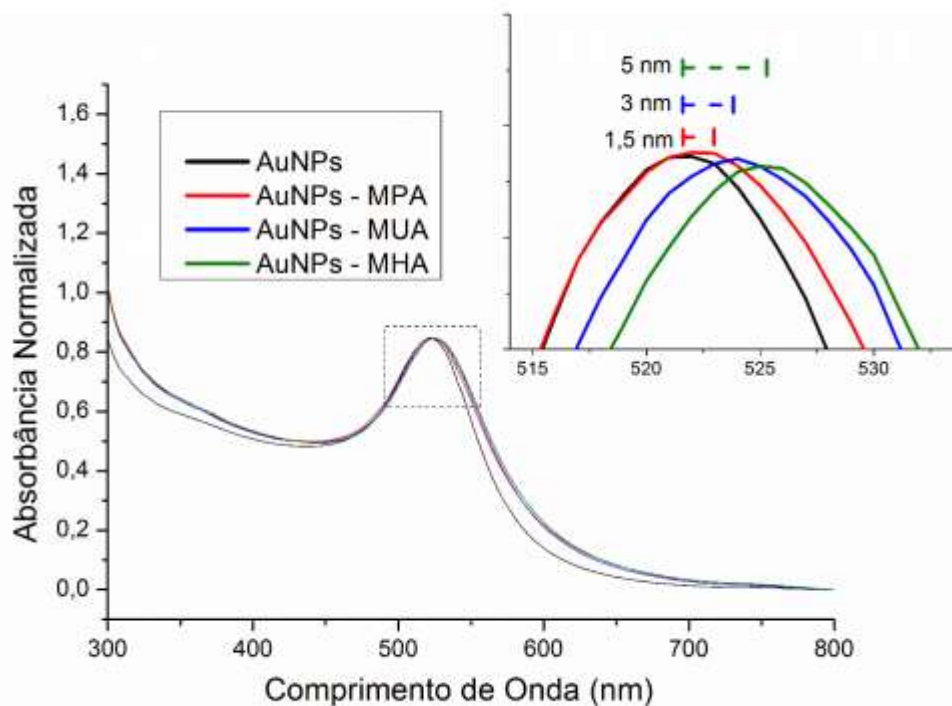


Figura 3. Espectroscopia de absorção UV/Vis normalizada de AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptopropanóico (MPA), ácido mercaptoundecanóico (MUA) e ácido mercaptohexadecanóico (MHA) após 100 horas de agitação (800rpm). O espectro de absorção das AuNP's utilizadas como controle é apresentado em preto; AuNP's-MPA (vermelho); AuNP's-MUA (azul) e AuNP's-MHA (verde). O detalhe na figura apresenta o deslocamento da banda em cada um dos ligantes. AuNP's-MPA (1,0 nm); AuNP's-MUA (3 nm); AuNP's-MHA (5nm).

A dependência do deslocamento da ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) em relação ao comprimento da cadeia dos ligantes também foi estudada em detalhe. A Tabela 2 lista os valores do comprimento de onda (λ) máximo para AuNP's, antes e após modificação com os ligantes e a dependência do deslocamento LSPR ($\Delta\lambda$) em função do comprimento da cadeia (X) dos ligantes é ilustrado na Figura 4. A regressão obtida evidencia o efeito da espessura da monocamada (ambiente dielétrico local) e da quimiossorção Au-S na LSPR. É possível verificar que a LSPR desloca para o vermelho 0,3 nm para cada átomo de carbono do espaçador utilizado. Uma vez que o índice de refração de todos os ligantes puros usados neste trabalho apresenta baixa variação, a

dependência linear do comprimento da cadeia pode ser atribuída ao aumento da espessura da monocamada. A dependência linear do comprimento de onda em relação à espessura das monocamadas também foi evidenciada por outros autores [35], investigando monocamadas em nanopartículas de prata, porém com um maior deslocamento por carbono da cadeia.

Tabela 2. Dados do deslocamento do comprimento de onda máximo da absorção de AuNP's modificado com alcanotíóis (SAMs) de vários comprimentos de cadeia.

AuNP's + Sigla do Ligante	Nome do Ligante	C _x	Antes da modificação	Após a modificação	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (nm)
AuNP's	AuNP's sem ligantes	C0	522	522	0
AuNP's -MPA	ÁcidoMercaptopropiônico	C3	522	523	1
AuNP's-MUA	ÁcidoMercaptoundecanóico	C11	522	525	3
AuNP's -MHA	ÁcidoHexadecanóico	C16	522	527	5

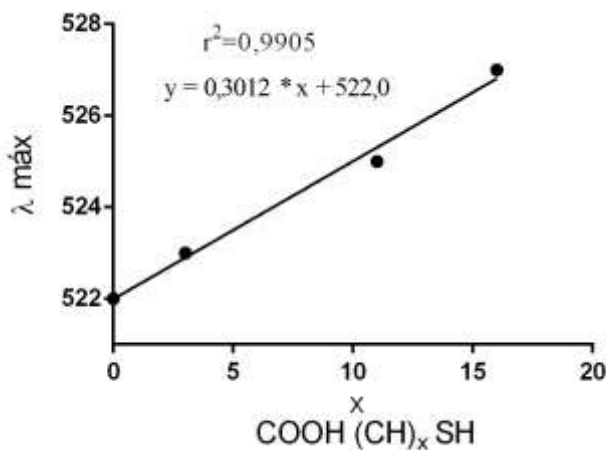


Figura 4. Dependência do comprimento da cadeia no deslocamento de pico espectral LSPR.

A substituição das moléculas estabilizadoras de citrato pelos ligantes com grupamentos tíóis foi confirmada por espectroscopia na região do Infravermelho tal como é indicado no espectro da Figura 5. Obteve-se o espectro de FTIR de cada ligante puro e após a funcionalização das AuNP's, para comparação dos espectros obtidos. A presença de moléculas orgânicas ligadas à superfície das nanopartículas foi confirmada, visto que os picos de vibração são observados na região que se estende do grupo C-H em torno de 2900 cm^{-1} para os ligantes MUA e MHA. Este espectro mostra picos em 2910 e 2840 cm^{-1} que são característicos da presença de vibrações de alongamento assimétricas e simétricas de –CH. Estas vibrações estão associadas a cadeia carbônica introduzida pela funcionalização da superfície das nanopartículas com os ligantes [36]. Na amostra com MPA, uma banda é

verificada em torno de 1390 cm^{-1} , que é atribuída a deformação axial dos grupos C-H alifáticos, conforme anteriormente relatado por [37]. As bandas em torno de 1600 cm^{-1} são características de vibrações de flexão de estiramento do grupo hidroxila [37-39]. Os deslocamentos encontrados em torno destas bandas de absorção podem ser indicativos da coordenação do ligante ao íon metálico. A larga banda encontrada entre 3000 e 3400 cm^{-1} está relacionada com as vibrações de alongamento O-H [40], podendo ser atribuída à presença de água pela desidratação incompleta da amostra.

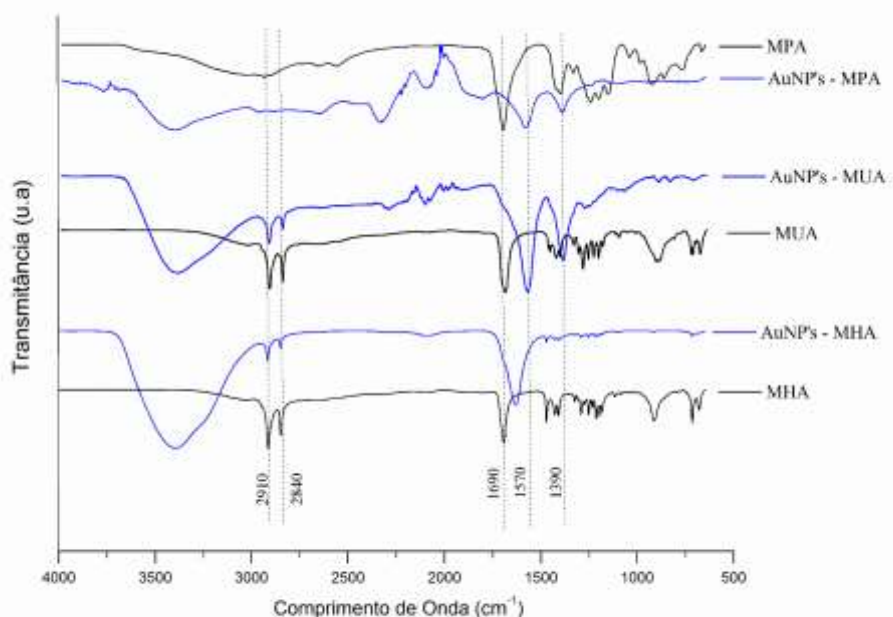


Figura 5. Espectro de Infra-Vermelho de nanopartículas metálicas funcionalizadas com os ligantes após 100 horas de agitação (800 rpm). Na cor preta é mostrado o ligante como controle e na cor azul é o espectro das AuNP's após a funcionalização. MPA – ácido mercapopropanóico; MUA – ácido mercapoundecanóico e MHA – ácido mercaptohexadecanóico.

Para confirmar a funcionalização das AuNP's, as amostras com e sem ligantes foram investigadas por espalhamento Raman. A Figura 6 traz os espectros de Raman de AuNP's e AuNP's modificadas pelo grupamento tiol dos ligantes utilizados. Os comprimentos de onda relacionados à posição dos grupos carboxílicos (1358 e 1571 cm^{-1}) são referentes à vibrações de alongamento assimétricas e simétricas (COO^{-1}), respectivamente [32]. Embora possa identificá-los em nossa amostra com AuNP's controle, o primeiro pico

está faltando no espectro das nossas AuNP's expostas aos ligantes tiolados. Este fato sugere que os íons sulfeto substituíram parte da cadeia de íons citrato na coordenação de AuNP's, criando uma espécie de camada de revestimento em torno delas. Também se observa um pico em torno de 1106 cm^{-1} no espectro de Raman de AuNP's funcionalizadas, o que pode indicar a presença de ligações S-C na amostra [41], os quais são visíveis devido ao espalhamento Raman amplificado de superfície (SERS). As maiores intensidades de fluorescência podem ser verificadas pelo mapa Raman em amarelo (Figuras 3B,3C,3D,3E), ponto interessante a ser analisado, pois mostrará com maior fidelidade as alterações na esfera de coordenação das nanopartículas. Os mapas do espalhamento Raman são complementares às medições feitas por TEM, e a formação de aglomerados em 3C e 3D pode ser devido a desidratação do material durante a secagem para análise no equipamento, já que este comportamento não foi observado na fase coloidal, avaliado por absorção óptica como mostrado na Figura 3.

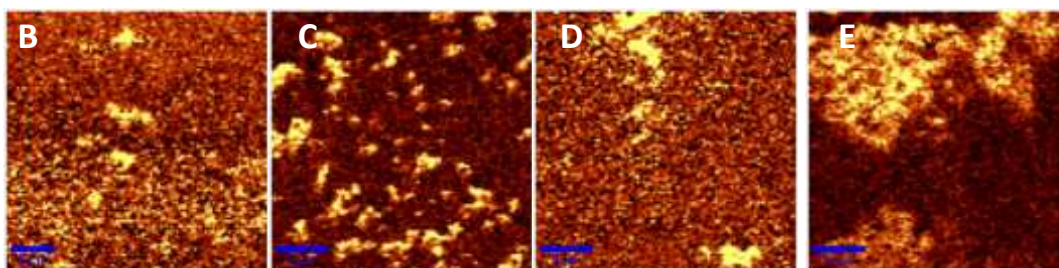
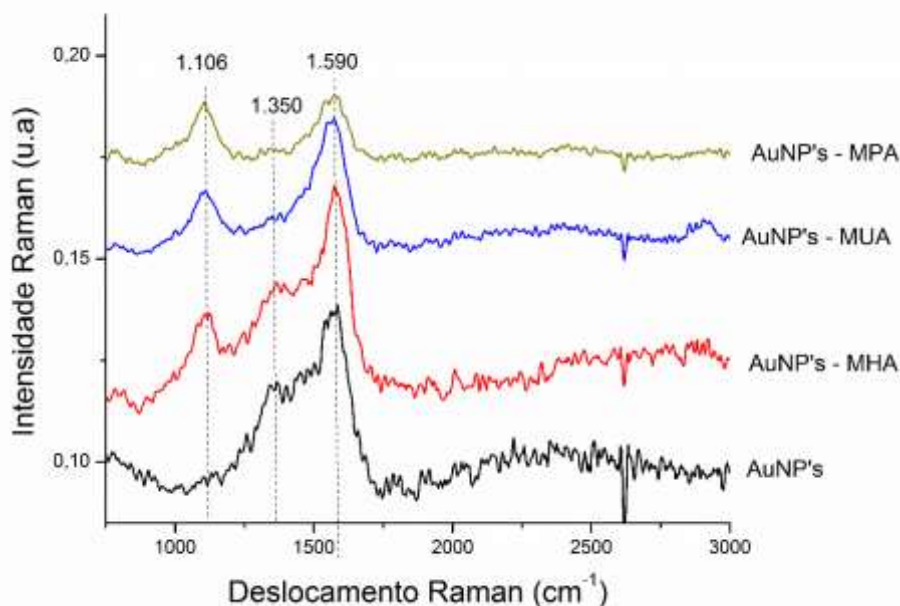
A

Figura 6. Espectro Raman de AuNP's e os ligantes após 100 horas de agitação (800 rpm) e temperatura ambiente (25°C). AuNP's controle sem ligantes (preto). AuNP's-MPA (vermelho); AuNP's-MUA (azul) e AuNP's-MHA (verde) (A); Imagens de microscopia de força atômica (mapa Raman) para as nanopartículas de ouro controle – AuNP's (B); e AuNP's-SAMs: AuPs-MPA (C), AuNP's-MUA (D) e AuNP's-MHA (E).

3.3 DETERMINAÇÃO DA ESPESSURA DAS MONOCAMADAS

A fim de estudar os efeitos dos ligantes em um nível de investigação mais aprofundado, um método semi-quantitativo utilizando imagens obtidas de Microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi elaborado, conforme mostrado em detalhes no artigo anterior [43]. Assim, a análise do espaçamento por MET forneceu uma estimativa da eficiência da funcionalização com espaçadores tiol de acordo com a distância entre as NP's. A Figura 7 abaixo apresenta a influência do comprimento da cadeia do ligante no espaçamento entre as partículas.

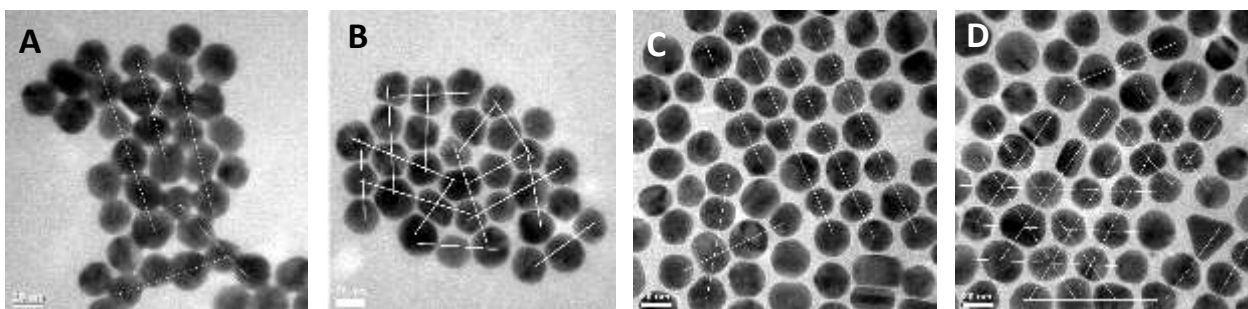


Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para as nanopartículas de ouro controle – AuNP's (A); e nanopartículas de ouro ligadas com os ligantes mercaptocarboílicos: AuPs-MPA (B), AuNP's-MUA (C) e AuNP's-MHA (D). Scale bar 10 nm

O tamanho das nanopartículas também foi avaliado por DLS e nota-se um aumento em relação aos valores encontrados para TEM. As imagens obtidas por TEM mostram apenas nanopartículas metálicas, visto que a parte orgânica não impede a transmissão dos elétrons. A técnica utilizando o DLS é dependente da superfície química e nesse caso, não só o metal, mas os íons carboxilatos, que estabilizam as AuNP's, influenciam os valores de diâmetro. Houve um ligeiro aumento do tamanho hidrodinâmico médio a medida que aumentava o comprimento da cadeia carbônica dos ligantes, como pode ser observado na Tabela 4, evidenciando uma funcionalização bem-sucedida.

Tabela 4. Valores referentes ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas com e sem ligantes obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)
AuNP's	31,00
AuNP's – MPA	32,50 / 101,00
AuNP's – MUA	32,70
AuNP's – MHA	37,10

3.4 DETERMINAÇÃO DA CARGA DE SUPERFÍCIE

O estudo da carga de superfície dos nanomateriais pode justificar a estabilidade coloidal e, assim, evitar sua aglomeração. Na prática, a carga é muitas vezes quantificada em termos de potencial zeta (ζ ou ZP) dado em mV. A equação de Poisson para campos elétricos

relaciona carga (C) e potencial elétrico (mV). No entanto, o potencial zeta pode não ser trivialmente convertido em densidades de carga de superfície, devido principalmente à geometria híbrida complexa das nanopartículas. Considera-se que o potencial de superfície é o potencial elétrico da nuvem difusiva de contra-íons. A carga de superfície depende da forma na qual as NP's estão dispersas (por exemplo, a carga de superfície das NP's com ligantes carboxilo-terminais dependerá do pH devido ao equilíbrio $\text{-COOH} \leftrightarrow \text{-COO}^- + \text{H}^+$). Além disso, o comprimento da nuvem difusa de íons depende da concentração e da valência iônica, sendo o ζ fortemente influenciado pelo meio circundante.

A estabilidade coloidal das AuNP's funcionalizadas com os ligantes estudados neste trabalho, foi inicialmente confirmada através da medição do potencial zeta para estimar a carga sobre a superfície do metal, conforme pode ser observado na Figura 8. A análise revelou que a carga sobre a superfície das AuNP's diminuiu de +104,10 para +44,98 utilizando o espaçador MPA, +92,42 usando o MUA e +64,19 com o MHA. A diminuição dos valores do ζ confirmam a hipótese de que as moléculas foram ligadas na superfície das nanopartículas. De um modo geral, as nanopartículas com ζ superior a 25 mV ou inferior a -25 mV foram relatadas como estáveis, por possuírem repulsão eletrostática suficiente para permanecerem estáveis em solução [42].

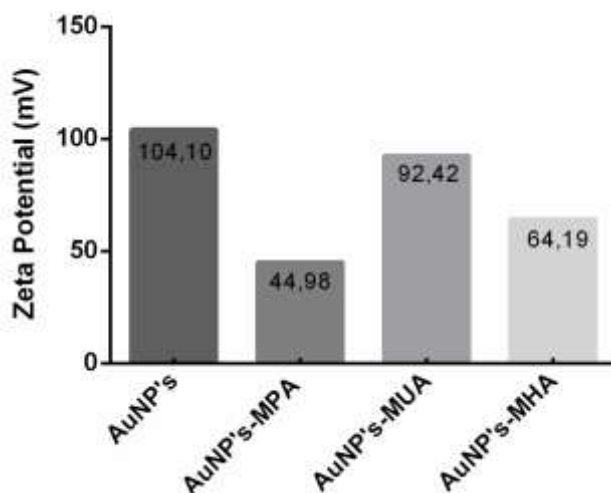


Figura 8. Medições da carga de superfície pelo potencial zeta para nanopartículas de ouro com diferentes ligantes utilizados.

3.5 ESTABILIDADE DAS AuNP'S COM SUPERFÍCIE MODIFICADA

Com a quimiossorção dos ligantes tiolados na superfície das AuNP's, há uma perda considerável das forças eletrostáticas que estabilizam o sistema devido a saída dos ânions carboxilatos do citrato adsorvidos a superfície metálica [44]. Sendo assim, após a formação da SAM's com ácido carboxílico terminal tem se especulado que o sistema fica mais vulnerável a agregação de partículas e esta desestabilização depende fortemente do pH do meio. Assim, o efeito do pH foi avaliado sobre as nanopartículas funcionalizadas com os ligantes utilizados neste trabalho. Esta estabilidade das AuNP's funcionalizadas é extremamente importante, pois a maioria dos ensaios de conjugação com biomoléculas envolve a alteração do pH do meio para atender o ponto isoelétrico (pI) da proteína ou pH de complexação da biomolécula de interesse. O experimento foi realizado utilizando as AuNP's sem ligantes e com os ligantes MPA, MUA e MHA nas faixas de pH de 3 a 10, conforme pode ser observado na figura 9.

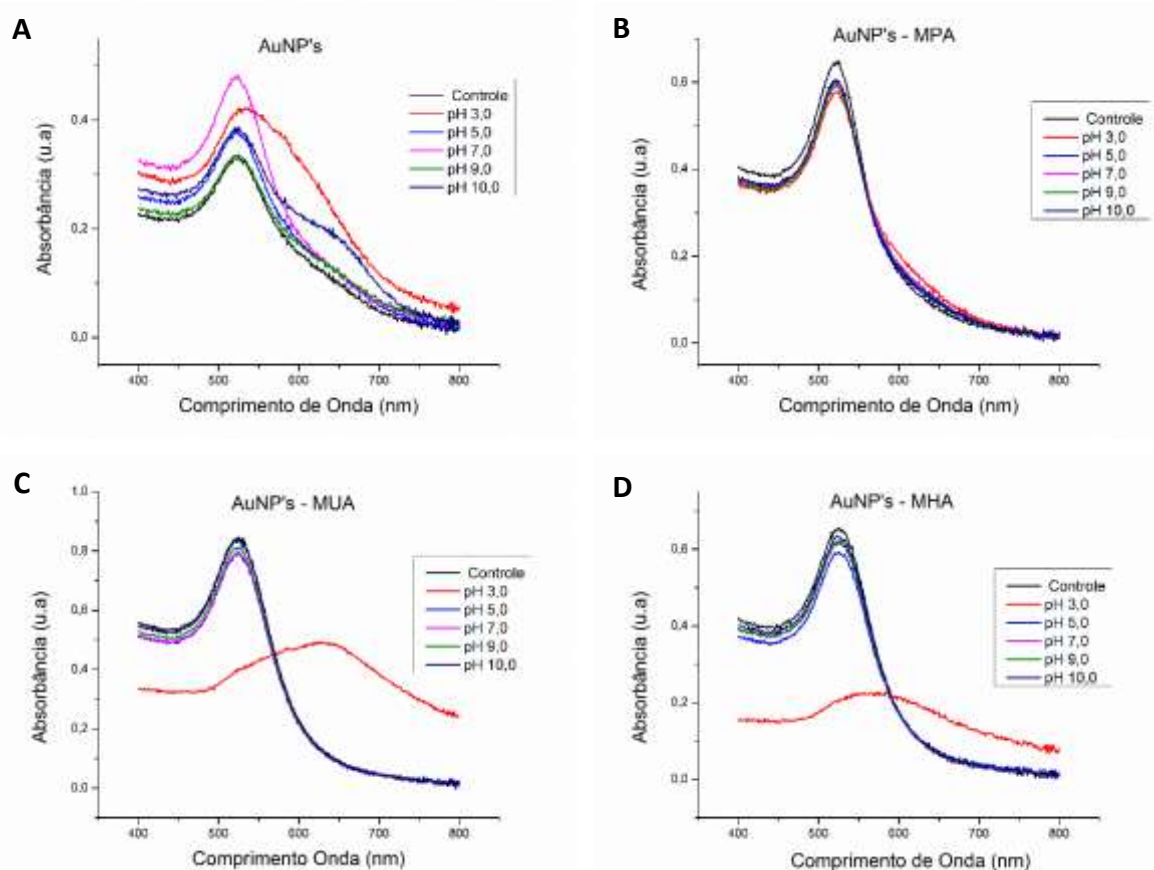


Figura 9. Espectro de absorção mostrando o colóide de ouro com os ligantes em diferentes faixas de pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 10,0) e o controle (sem alteração no pH do meio). AuNP's sem ligantes (A); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptopropanóico (MPA) (B); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptoundecanóico (MUA) (C); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptohexadecanóico (MHA) (D);

A teoria de espalhamento de Mie evidencia que nanopartículas metálicas com raio menores do que o comprimento de onda da luz e dispersas num meio dielétrico absorvem fortemente a certos comprimentos de onda, devido a excitação da ressonância plasmônica de superfície [45,46]. Para o ouro coloidal num meio aquoso, isto ocorre em torno de 520 nm. No entanto, se as partículas coloidais agregarem tal que a distância entre as esferas de agregação torne-se pequenas em comparação com o seu raio, ressonâncias adicionais ocorrerão em comprimentos de onda maiores do que partículas individuais [29]. Isto resulta em um deslocamento para o vermelho e um alargamento do espectro de absorção. Com base nesta observação, um "parâmetro de floculação" foi definido por Weisbecker [47] e mais tarde modificado por Maya [48] como a integral do espectro de absorção entre 600 e 800 nm, como uma medida semi-quantitativa da agregação. Uma vez que a absorção de soluções coloidais aumenta em maiores comprimentos de onda sobre a agregação de

partículas, o parâmetro de floculação aumenta com a extensão da agregação de partículas [47,48]. Na figura 10 abaixo é apresentado o parâmetro de floculação calculado em função do pH. Para todos os ensaios as AuNP's sem os ligantes apresentaram-se estáveis em pH neutro, alcalino e ligeiramente ácido ($\text{pH} > 5$). As AuNP's com superfície modificada apresentaram a mesma tendência, com exceção do ligante MPA que permaneceu estável em toda a faixa de pH avaliada (3 a 10), conforme evidenciado pelo parâmetro de floculação. A instabilidade apresentada pelos demais ligantes em $\text{pH} < 5$ pode ser explicada pelo fato de que o pKa do ácido carboxílico terminal é 4, assim, a repulsão eletrostática entre partículas nessa faixa de pH é reduzida [49].

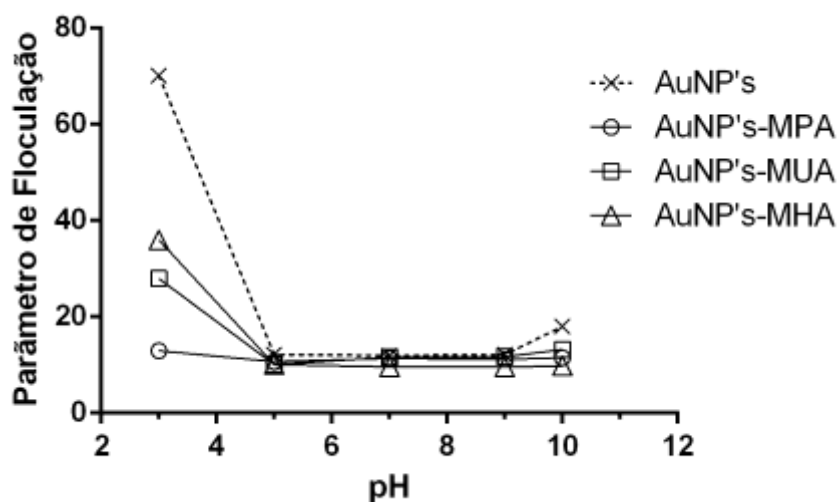


Figura 10. Parâmetro de Floculação em relação ao pH do ouro coloidal com diferentes ligantes.

Para ser útil para aplicações biológicas, AuNP's devem apresentar estabilidade não apenas numa larga faixa de pH, mas também ao longo de diferentes condições de força iônica [50]. Para avaliar esta estabilidade, as nanopartículas com a superfície modificada foram submetidas a diferentes concentrações de NaCl e tiveram seu espectro de absorção avaliado a fim de investigar a influência do comprimento dos ligantes em função da força iônica (Figura 11). As nanopartículas sem o uso de ligantes são estáveis até uma concentração de NaCl de 10mM a pH 7, sem qualquer alteração detectável no espectro de absorção. A agregação induzida por NaCl ocorre a partir dos 5mM para os ligantes avaliados e é mais pronunciado em 10mM, como pode ser observado a partir da diminuição da absorbância a 522 nm e o aumento da absorbância a comprimentos de onda mais longos.

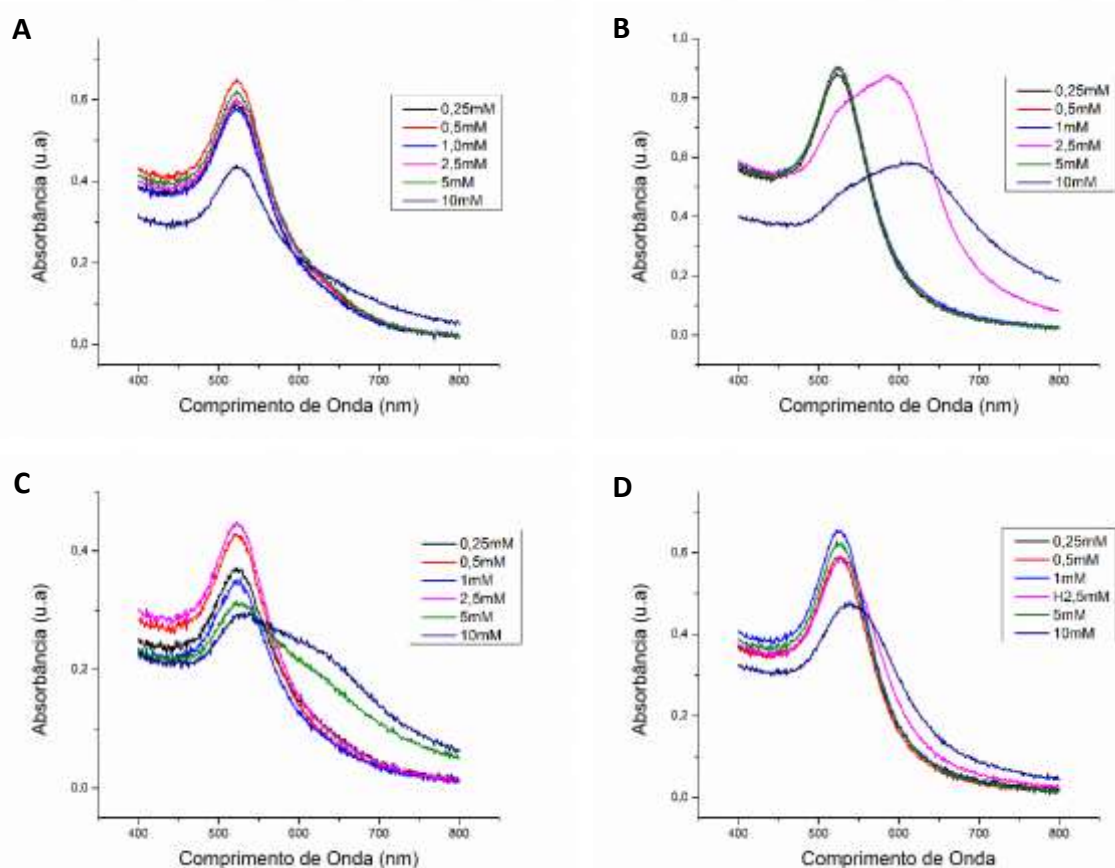


Figura 11. Espectro de absorção mostrando o colóide de ouro com os ligantes em diferentes concentrações de NaCl (0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 mM). AuNP's sem ligantes (A); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptopropanóico (MPA) (B); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptoundecanóico (MUA) (C); AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptohexadecanóico (MHA) (D);

O parâmetro de floculação também foi medido e a Figura 12 mostra o efeito do comprimento do ligante sobre a estabilidade do colóide metálico. Para o ligante de menor cadeia (MPA), o parâmetro de agregação aumenta a partir da concentração de 2,5mM de NaCl. Esta observação também pode ser atribuída para o ligante MUA que apresentou perfil semelhante no parâmetro de floculação, embora tenha tido um ligeiro aumento neste parâmetro. As AuNP's com o ligante de maior cadeia (MHA) apresentaram boa estabilidade e baixa agregação na maior concentração de NaCl avaliada neste estudo (10 mM). De uma maneira geral, estes resultados sugerem uma correlação direta entre o comprimento da cadeia do ligante e a estabilidade das nanopartículas com superfície modificada. Outros autores [50] relataram influência direta do tamanho da cadeia de peptídeos na estabilidade de AuNP's em diferentes condições de força iônica.

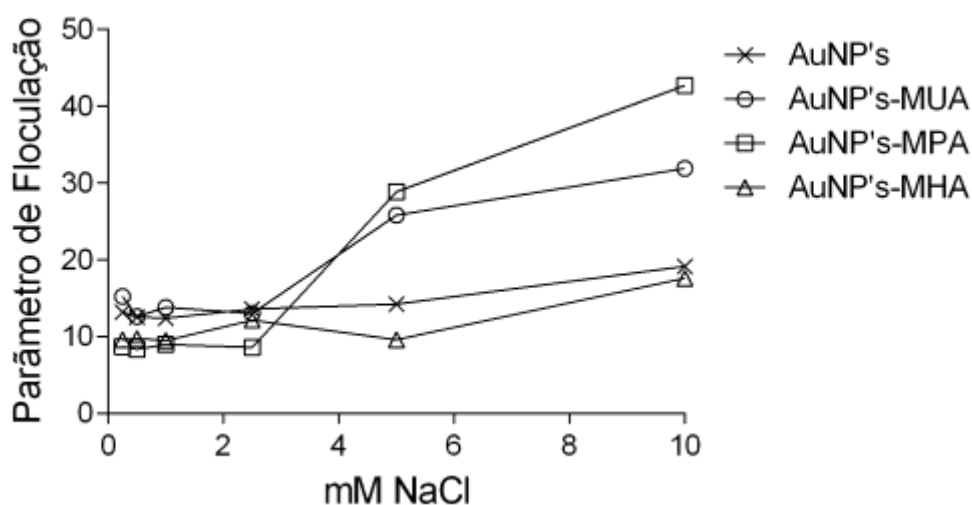


Figura 12. Parâmetro de Floculação em relação a concentração de sais no ouro coloidal com diferentes ligantes.

3.6 OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE ACOPLAMENTO VIA EDC/NHS

A figura 13 ilustra o esquema detalhado do acoplamento utilizando o EDC/NHS com as etapas para ativação do grupo funcional do ligante para a interação com a proteína de interesse. Resumidamente, o EDC foi utilizado para ativar AuNP's e permitir-lhes reagir facilmente com os grupamentos amina da proteína. O primeiro passo no mecanismo de ativação é a adição de um grupo OH do ácido carboxílico através de uma das ligações duplas do reagente carbodiimida, formando o intermediário O-acilureia. Em princípio, esse intermediário pode reagir diretamente com uma amina primária da proteína, mas esta reação sofre algumas limitações, tais como a baixa velocidade da reação, a susceptibilidade a hidrólise (tornando- instáveis e de curta duração em solução aquosa), além da produção de uma N-acilureia, que não é reativa [51]. A fim de competir de forma eficiente com a última reação e para fornecer uma maior estabilidade, o grupo abandonador NHS (N-hidroxissuccinimida) foi utilizado, sendo capaz de reagir com a amina primária e auxiliar no acoplamento proteico na presença de EDC. A reação inclui a formação de um éster ativo do intermediário (o produto de condensação do grupo carboxílico e N-hidroxissuccinimida) que pode ainda reagir com um grupo amina da proteína formando finalmente uma ligação amida [51].

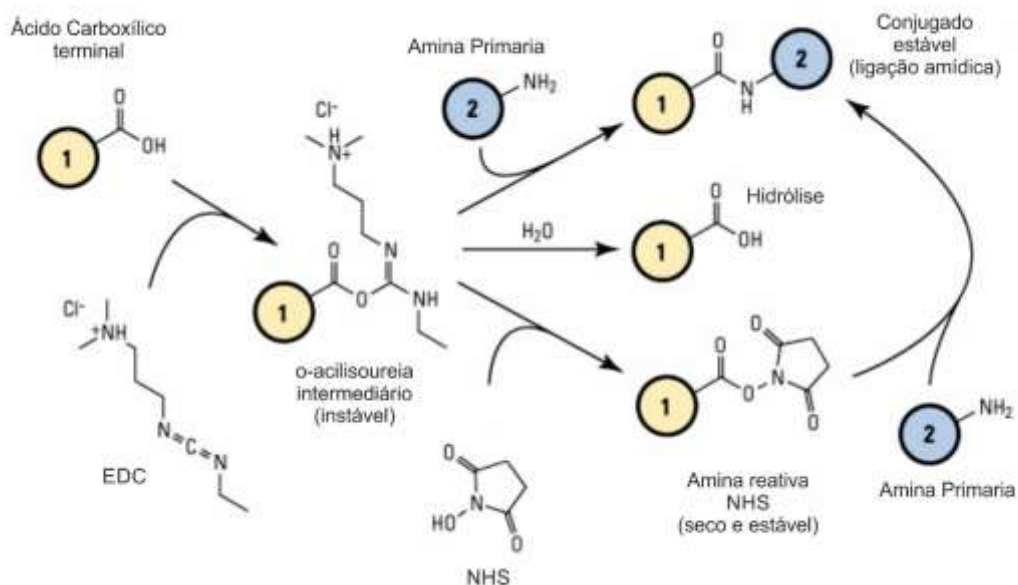


Figura 13. Esquema dos principais caminhos que podem estar envolvidos no mecanismo de ativação de grupos COOH por acoplamento carbodiimida (EDC) assistida ou não por NHS.

A eficiência do acoplamento utilizando EDC/NHS é normalmente baixa e sensível a variações de pH. Além disso, a estabilidade coloidal depende de um equilíbrio delicado de interações de atração e de repulsão, com isso, protocolos de acoplamento requerem um certo grau de otimização para não perder a estabilidade e alcançar a eficiência desejada. As condições ótimas reacionais podem variar de acordo com a composição, tamanho e forma do metal e devido a sua baixa estabilidade, vários estudos têm relatado diferentes concentrações do EDC/NHS para acoplamento de biomoléculas [27,28,52,53].

Neste trabalho nós investigamos a razão molar ótima para a conjugação de proteínas usando a proteína sérica bovina (BSA) como modelo. Para esta otimização foi utilizado o ligante de cadeia intermediária (MUA) como padrão e a quantificação de proteínas totais foi realizada por fluorescência. Este método utiliza a fluorescência intrínseca da proteína, que pode ser atribuída à combinação da fluorescência dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina presentes na cadeia proteica. A excitação foi realizada em 280 nm e a emissão foi varrida de 300 a 500 nm. O comprimento de onda de 350 nm foi utilizado para realização da curva padrão, conforme pode ser observado na figura 14.

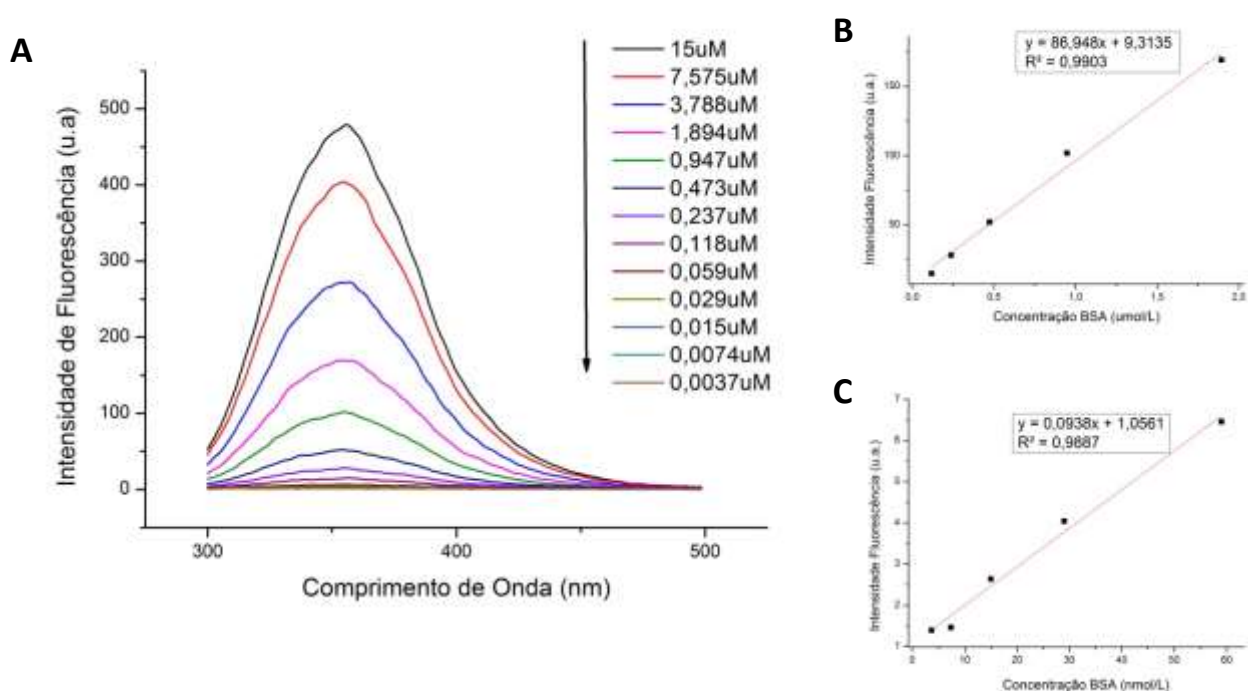


Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência na detecção de BSA (A) para excitação em 280 nm e curva padrão obtida nas concentrações de 0,1 a 2 umol/L (B) e 2,5 a 60 nmol/L (B e C).

A figura 15 apresenta a taxa de proteínas totais em função de cada razão molar EDC/NHS para a bioconjugação com BSA. A reação sem o uso do grupo estabilizador (NHS) também foi realizada (Razão molar EDC/NHS 1:0), já que alguns protocolos têm relatado este tipo de acoplamento. A razão molar ótima para este ensaio foi 1:1,5 (EDC/NHS). Houve uma diminuição da eficiência de conjugação com excesso da quantidade do grupo abandonador (NHS), que pode ser devido a competição com a proteína pelos grupos COOH ativados com EDC.

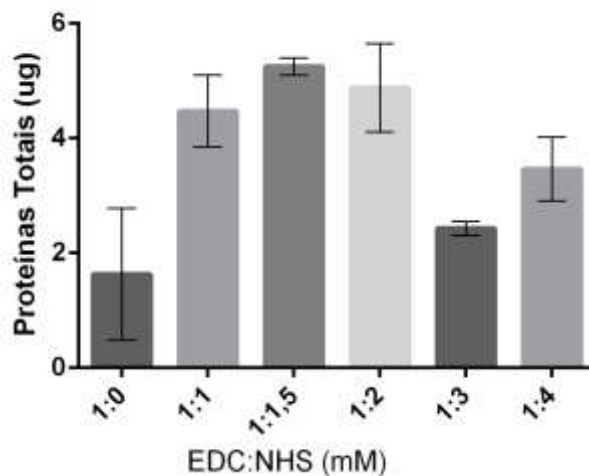


Figura 15. Efeito da razão molar entre o ativador de ácido carboxílico (EDC) e o NHS (estabilizante) no acoplamento de proteínas na superfície das nanopartículas metálicas de ouro.

Após o ensaio de otimização da reação de acoplamento, a bioconjugação foi realizada com todos os espaçadores (MPA, MUA e MHA) e também com as AuNP's sem ligantes a fim de determinar a eficiência da conjugação proteica apenas pela interação eletrostática. A figura 16 mostra os resultados de proteínas totais (μM) presentes na superfície das nanopartículas, com e sem a superfície modificada. Os dados apontam um aumento do número de proteínas à medida que há um aumento no comprimento do ligante. Este resultado já era esperado, visto que com o aumento do comprimento dos ligantes há um aumento da esfera de coordenação das nanopartículas, fazendo com que mais proteínas possam ser ancoradas na superfície covalentemente.

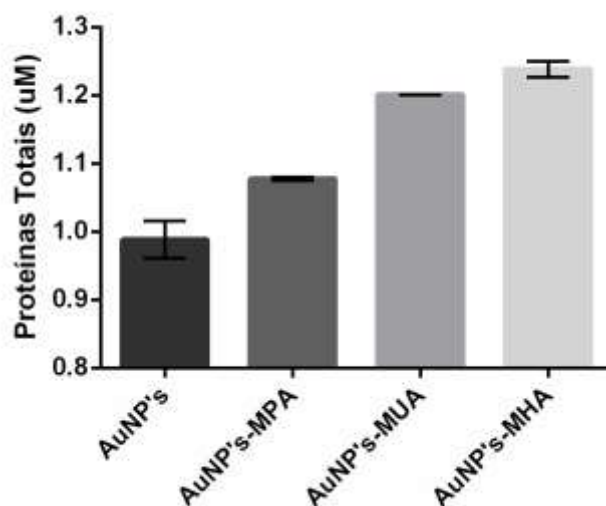


Figura 16. Influência do comprimento do espaçador na imobilização e proteínas (BSA). MPA, ácido mercaptopropiônico, comprimento do espaçador: 3 átomos de carbono; Ácido mercaptoundecanóico (MUA), comprimento do espaçador: 11 átomos de carbono; MHA, ácido mercaptohexadecanóico, comprimento do espaçador: 16 átomos de carbono.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo nós avaliamos o uso de ligantes mercaptocarboxílicos de diferentes comprimentos de cadeia e discutimos detalhadamente desde a sua funcionalização, utilizando técnicas padrão como UV-Vis, IR, Raman, DLS, ZP e TEM. Um estudo detalhado sobre a estabilidade em diferentes faixas de pH e força iônica foi realizado a fim

de identificar a condição ideal de trabalho para cada ligante. Os resultados apontaram que nem sempre um maior tamanho da cadeia confere maior estabilidade. O menor ligante avaliado (MPA) apresentou estabilidade numa faixa ampla de pH (3 a 10), no entanto a estabilidade relacionada a força iônica foi melhor para o ligante de maior comprimento de cadeia (MHA). Por fim, uma otimização utilizando os intermediários EDC/NHS foi realizada para conjugação com biomoléculas utilizando proteína sérica bovina (BSA) como modelo. Os dados apresentados apontam a influência do comprimento da cadeia nas etapas de acoplamento covalente e não covalente com nanomateriais. Nossos resultados abrem novas perspectivas no entendimento da influência da espessura das monocamadas na geração de nanobioconjugados reprodutíveis e estáveis para diversas aplicações.

5. REFERÊNCIAS

- [1]. Zargar, B., Hatamie A. A simple and fast colorimetric method for detection of hydrazine in water samples based on formation of gold nanoparticles as a colorimetric probe. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013, 182, pp.706–710, DOI:10.1016/j.snb.2013.03.036.
- [2]. Terentyuk, G. S., Maslyakova, G. N., Suleymanova, L. V., Khlebtsov, N. G., Khlebtsov, B. N., Akchurin, G. G., Maksimova, I. L., Tuchin, V.V. Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: toward cancer phototherapy. *Journal of Biomedical Optics*. 2009, 14(2), pp.1-9, DOI: 10.1117/1.3122371.
- [3]. Zhou, Y., Dong, H., Liu, L., Li, M., Xiao, K., Xu, M. Selective and sensitive colorimetric sensor of mercury (II) based on gold nanoparticles and 4-mercaptophenylboronic acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014, 196, pp.106-111. DOI: 10.1016/j.snb.2014.01.060.
- [4]. Peng, G., Tisch, U., Adams, O., Hakim, M., Shehada, N., Broza, Y. Y., Bilan, S., Abdah-Bortnyak, R., Kuten, A., Haick, H. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*. 2009, 4(10), pp.669-673. DOI: 10.1038/nnano.2009.235.
- [5]. Stuchinskaya, T., Moreno, M., Cook, M. J., Edwards, D. R., Russell, D. A. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody–phthalocyanine–gold nanoparticle conjugates. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2011, 10(5), pp.822-31. DOI: 10.1039/c1pp05014a.
- [6]. Jain, P.K., El-Sayed, I.H., El-Sayed M.A. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*. 2007, 2(1), pp.18-29. DOI: 10.1016/S1748-0132(07)70016-6
- [7]. Sperling, R.A., Rivera-Gil, P., Zhang, F., Zanella, M., Parak, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*. 2008, 37(9), pp.1896-1908. DOI: 10.1039/b712170a.
- [8]. El-Sayed, M. A. Small Is Different: Shape-, Size-, and Composition-Dependent Properties of Some Colloidal Semiconductor Nanocrystals. *Accounts of Chemical Research*. 2004, 37(5), pp.326-333. DOI: 10.1021/ar020204f.

- [9]. Schroeder, A., Heller, D.A., Winslow, M.M., Dahlman, J.E., Pratt, G.W., Langer, R., Jacks, T., Anderson, D.G. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews. Cancer*. 2012, 12(1), pp.39-50. DOI: 10.1038/nrc3180.
- [10]. Saha, K., Agasti, S.S., Kim, C., Li, X., Rotello, V.M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*. 2012, 112(5), pp.2739-2779. DOI: 10.1021/cr2001178.
- [11]. Arruebo M., Valladares M., e Gonzalez-Fernandez A. Nanopartículas de anticorpos conjugados para aplicações biomédicas, *J. Nanomater.* 2009, DOI: 10.1155 / 2009/439389.
- [12] Lacerda, S. H. D.; Park, J. J.; Meuse, C.; Pristinski, D.; Becker, M. L.; Karim, A.; Douglas, J. F. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS Nano*. 2010, 4(1), pp.365–379. DOI: 10.1021/nm9011187.
- [13] Lynch, I.; Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*. 2008, 3(1–2), pp.40–47. DOI: 10.1016/S1748-0132(08)70014-8.
- [14] R. Levy, Z.X. Wang, L. Duchesne, R.C. Doty, A.I. Cooper, M. Brust, D.G. Fernig. A generic approach to monofunctionalized protein-like gold nanoparticles based on immobilized metal ion affinity chromatography. *Chembiochem*. 2006, 7(4), pp.592-594. DOI: 10.1002/cbic.200500457.
- [15] MacCuspie, R. I.; Allen, A. J.; Hackley, V. A. Dispersion stabilization of silver nanoparticles in synthetic lung fluid studied under in situ conditions. *Nanotoxicology*. 2011, 5(2), pp.140-156. DOI: 10.3109/17435390.2010.504311.
- [16] D. Bartczak, A. Kanaras. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir*. 2011, 27(16), pp.10119–10123. DOI: 10.1021/la2022177.
- [17] A. Sukhanova, K. Even-Desrumeaux, A. Kisserli, T. Tabary, B. Reveil, J.M. Millot, P. Chames, D. Baty, M. Artemyev, V. Oleinikov, M. Pluot, J.H.M. Cohen, I. Nabiev. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward new generation of ultra-small diagnostic nanoprobe. *Nanomedicine*. 2012, 8(4), pp. 516-525. DOI: 10.1016/j.nano.2011.07.007.
- [18] R. Wilson, Y. Chen, J. Aveyard. One molecule per particle method for functionalising nanoparticles. *Chemical Communications*. 2004, 10, pp. 1156–1157. DOI: 10.1039/B402786H.
- [19] Pease, L. F.; Tsai, D. H.; Zangmeister, R. A.; Zachariah, M. R.; Tarlov, M. J. J. Quantifying the surface coverage of conjugate molecules on functionalized nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2007, 111 (46), pp.17155–17157. DOI: 10.1021/jp075571t.
- [20] Tsai, D. H.; Zangmeister, R. A.; Pease, L. F.; Tarlov, M. J.; Zachariah, M. R. Gas-phase ion-mobility characterization of SAM-functionalized Au nanoparticles. *Langmuir*. 2008, 24 (16), pp.8483–8490. DOI: 10.1021/la7024846.
- [21]. Silvia, F.; Sally, P.; David, AR; Kim, ES. Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of the biosurfaces. *Trends in Analytical Chemistry*. 2000, 19(9), pp.530-540. DOI: 10.1016/S0165-9936(00)00032-7.
- [22]. S Kumar¹, J Aaron¹ & K Sokolov. Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nature Protocols*. 2008, 3, pp. 314-320. DOI:10.1038/nprot.2008.1.

- [23]. Anand Gole and Catherine J. Murphy Azide-Derivatized Gold Nanorods: Functional Materials for “Click” Chemistry. *Langmuir*. 2008, 24 (1), pp. 266–272. DOI: 10.1021/la7026303.
- [24]. Smita Thobhani¹, Simon Attree, Robert Boyd, Neelam Kumarswami, James Noble, Mateusz Szymanski, Robert A. Porter. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *Journal of Immunological Methods*. 2010, 356(1-2), pp.60-69. DOI: 10.1016/j.jim.2010.02.007.
- [25]. GT Hermanson. *Bioconjugate Techniques*. 1996, Academic Press, New York.
- [26]. Ver artigo 1 desta tese (dados não publicados).
- [27]. G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, 2008.
- [28]. D. Bartczak, A. Kanaras, Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling, *Langmuir* 27 (2011) 10119–10123.
- [29]. S.-Y. Lin, Y.-T. Tsai, C.-C. Chen, C.-M. Lin e C.-H. Chen. Two-Step Functionalization of Neutral and Positively Charged Thiols onto Citrate-Stabilized Au Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, 108 (7), pp.2134-2139. DOI: 10.1021/jp036310w.
- [30]. RP Briñas, M. Maetani e JJ Barchi. A survey of place-exchange reaction for the preparation of water-soluble gold nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013, 392, pp.415-421. DOI: 10.1016/j.jcis.2012.06.042.
- [31]. Friederike Gasiorek, Ervice Pouokam, Martin Diener, Sabine Schlecht and Mathias S. Wickleder. Effects of multivalent histamine supported on gold nanoparticles: activation of histamine receptors by derivatized histamine at subnanomolar concentrations. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2015, 13(39), pp.9984-9992. DOI: 10.1039/C5OB01354B.
- [32]. Mak JSW, Rutledge SA, Abu-Ghazalah RM, Eftekhari F, Irizar TNCM, Zheng G, Helmy AS. Recent developments in optofluidic-assisted Raman spectroscopy. *Progress in Quantum Electronics*. 2013, 37(1), pp.1-50. DOI: 10.1016/j.pquantelec.2012.11.001
- [33]. D. Flynn, N. T.; Tran, T. N. T.; Cima, M. J.; Langer, R. Long-Term Stability of Self-Assembled Monolayers in Biological Media. *Langmuir*. 2003, 19(26), pp.10909-10915. DOI: 10.1021/la035331e.
- [34]. 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*, 2005, 105(4), pp.1103-1170. DOI: 10.1021/cr0300789.
- [35]. Amanda J. Haes , Shengli Zou , George C. Schatz , and Richard P. Van Duyne. A Nanoscale Optical Biosensor: The Long Range Distance Dependence of the Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metal Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004, 108 (1), pp. 109–116. DOI: 10.1021/jp0361327.
- [36]. Feng AL, You ML, Tian L, Singamaneni S, Liu M, Duan Z, Lu TJ, Xu F, Lin M. Distance-Dependent Plasmon-Enhanced Fluorescence of Upconversion Nanoparticles using Polyelectrolyte Multilayers as Tunable Spacers. *Scientific Reports*. 2015, 5, pp. 1-10. DOI: 10.1038/srep07779.
- [37]. P.G. Roeges. A Guide to the Complete Interpretation of Infrared Spectra of Organic Structures. *Journal of Chemical Education*. 1995, 72(4), p. A93. DOI: 10.1021/ed072pA93.4.
- [38]. D. Lin Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Graselli. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. 1st edition, 1991, Academic Press, San Diego.
- [39]. G. Socrates. *Infrared Characteristic Group Frequencies*. 1994, 2nd edition, John Wiley and Sons, UK.

- [40]. Stuart, B. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. 1997, ACOL Series, Wiley, Chichester, UK.
- [41]. Adilson R. Prado, Jairo P. Oliveira, Rayssa H. A. Pereira, Marco C. C. Guimarães, Breno V. Nogueira, Eustáquio. V. R. Castro, Luiz. C. P. Almeida, Moisés R. N. Ribeiro, Maria J. Pontes. Surface-Enhanced Raman Plasmon in Self-Assembled Sulfide-Coated Gold Nanoparticle Arrays. *Plasmonics*. 2015, 10(5), pp.1097–1103. DOI: 10.1007/s11468-015-9909-2.
- [42]. Kuznetsova, Y.V.; Rempela, A. A. Size and Zeta Potential of CdS Nanoparticles in Stable Aqueous Solution of EDTA and NaCl. *Inorganic Materials*. 2015, 51, pp.215–219. DOI: 10.1134/S0020168515020119.
- [43]. Dados não publicados. Ver artigo 2 desta tese.
- [44]. Kadir Aslan and Víctor H. Pérez-Luna. Surface Modification of Colloidal Gold by Chemisorption of Alkanethiols in the Presence of a Nonionic Surfactant. *Langmuir*. 2002, 18(16), pp.6059–6065. DOI: 10.1021/la025795x.
- [45]. Schmitt, J. ; Mächtle, P. ; Eck, D. ; Möhwald, H. ; Helm, CA. Preparation and Optical Properties of Colloidal Gold Monolayers. *Langmuir*. 1999, 15(9), pp.3.256-3.266. DOI: 10.1021/la981078k.
- [46]. Eck, D. ; Helm, CA; Wagner, NJ; Vaynberg, KA. Plasmon resonance measurements of the adsorption and adsorption kinetics of a biopolymer onto gold nanocolloids. *Langmuir*. 2001, 17(4), pp.957-960. DOI: 10.1021/la001142+.
- [47]. Tsai, D. H.; Hawa, T.; Kan, H. C.; Phaneuf, R. J.; Zachariah, M. R. Spatial and size-resolved electrostatic-directed deposition of nanoparticles on a field-generating substrate: theoretical and experimental analysis. *Nanotechnology*. 2007, 18(36). DOI: 10.1088/0957-4484/18/36/365201.
- [48]. Mulvaney, P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir*. 1996, 12(3), pp.788-800. DOI: 10.1021/la9502711.
- [49]. Tandford, C. The Interpretation Of Hydrogen Ion Titration Curves Of Proteins. *Advances in Protein Chemistry*. 1962, 17, pp.69-165. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60052-2
- [50]. Raphaël Lévy, Nguyen T. K. Thanh, R. Christopher Doty, Irshad Hussain, Richard J. Nichols, David J. Schiffrin, Mathias Brust , and David G. Fernig. Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2004, 126(32), pp.10076–10084. DOI: 10.1021/ja0487269.
- [51]. Sam, S.; Touahir, L.; Andresa, J.S.; Allongue, P.; Chazalviel, A.C.; Gouget-Laemmel, A.C.; Villeneuve, C.H.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N. et al. Semiquantitative Study of EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces. *Langmuir*. 2010, 26(2), pp.809-814. DOI: 10.1021/la902220a.
- [52]. Mir Hadi Jazayeri , Hamed Amani, Ali Akbar Pourfatollah, Hamidreza Pazoki-Toroudi, Bijan Sedighimoghaddam. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research*. 2016, 9, pp.17-22. DOI: 10.1016/j.sbsr.2016.04.002.
- [53]. Cheng-Hung Li Tsung-Rong Kuo, Hsin-Jan Su Wei-Yun Lai, Pan-Chyr Yang, Jinn-Shiun Chen, Di-Yan Wang, Yi-Chun Wu & Chia-Chun Chen. Fluorescence-Guided Probes of Aptamer-Targeted Gold Nanoparticles with Computed Tomography Imaging Accesses for in Vivo Tumor Resection. *Scientific Reports* 5. 2015. DOI: 10.1038/srep15675.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

Padronização do tempo e rotação de centrifugação do coloide metálico

A fim de padronizar a velocidade e o tempo de rotação para evitar perda de material entre as lavagens das AuNP's nas etapas de acoplamento com os ligantes e de conjugação com proteínas, foi realizada uma otimização para determinação dos parâmetros de centrifugação. O material sintetizado de acordo procedimento descrito na seção de metodologia foi submetido a centrifugação em 86, 344, 2.152, 8.608 e 16.873 g por 5, 10 e 20 minutos, tendo sido coletadas as frações superior (sobrenadante) e inferior (pellet) dos tubos. Este material foi analisado por absorção óptica (UV-Vis). O comprimento de onda máximo (λ máx) e a absorbância foram avaliados para escolha da melhor condição. Os resultados são mostrados na Tabela S1 e Figura S1. Apenas na velocidade de 14.000 rpm no tempo de 20 minutos não foi detectado nanopartículas metálicas na superfície. Assim, a velocidade de 14.000 rpm e o tempo de 20 minutos foram selecionados para todas as etapas que envolvem a lavagem dos nanomateriais sintetizados, visto que estas condições apresentaram menor absorbância para o sobrenadante e não apresentou agregação das partículas do pellet.

Tabela S1. Valores obtidos pelo espectro de absorção UV-Vis para determinação do tempo e rotação ideal de centrifugação sem perda de material.

Rotação (rpm)	Tempo (min)	λ máx	Absorbância	λ máx	Absorbância
		Sobrenadante *		Pellet **	
1.000	5	522	0,8347	522	0,8846
	10	522	0,8295	522	0,8487
	20	522	0,7844	522	0,8462
2.000	5	522	0,8455	522	0,8491
	10	521	0,8299	522	0,8546
	20	522	0,7696	522	0,9679
5.000	5	522	0,7457	522	0,9996
	10	521	0,6243	521	0,9996
	20	521	0,3208	523	0,9992
10.000	5	522	0,4619	521	0,9995
	10	521	0,1658	521	0,9996
	20	527	0,0108	521	0,9997
14.000	5	522	0,2011	522	0,9992
	10	525	0,0521	521	0,9995
	20	533	0,0042	524	0,9998

*Fração 1 – Fração coletada na superfície do eppendorf após a centrifugação;

**Fração 2 – Fração coletada no pellet formado no eppendorf após a centrifugação.

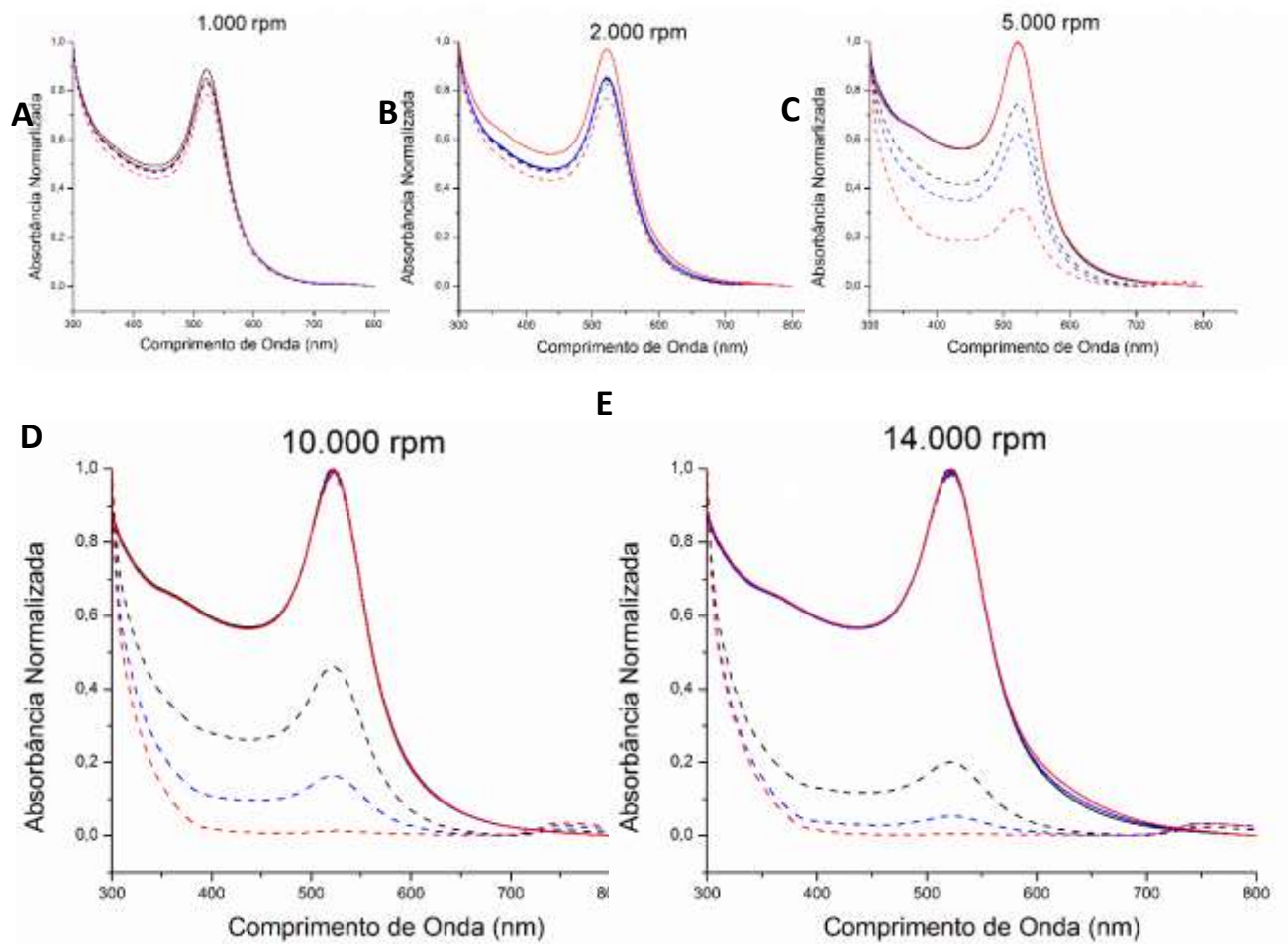


Figura S1. Espectros de absorção UV/Vis de nanopartículas metálicas submetidas a diferentes condições de centrifugação: 1.000rpm (A); 2.000rpm (B), 5.000rpm (C); 10.000 rpm (D) e 14.000 rpm (E). Linhas pontilhadas são referentes a fração superior (sobrenadante) após a centrifugação e linhas contínuas são referentes ao pellet ressuspensado em água ultrapura. Cores: preto (5 min), azul (10 min) e vermelho (20 min).

Determinação da Distribuição e da Razão de Aspecto das AuNP's

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram capturadas em diferentes ampliações para estudar a sua distribuição de tamanho. Como as AuNP's não são totalmente esféricas, a razão de aspecto foi determinada através da medição do diâmetro maior (DM) e do seu diâmetro perpendicular, sendo considerado como diâmetro menor (Dm) para cada nanopartículas metálica. A Figura S2 apresenta o esquema ilustrativo da influencia da razão de aspecto na forma das nanopartículas metálicas e a Equação S1 mostra a fórmula para determinação da razão de aspecto. Exemplos de imagens que foram utilizadas para a determinação da distribuição e para a determinação da razão de aspecto são apresentados na Figura S3.

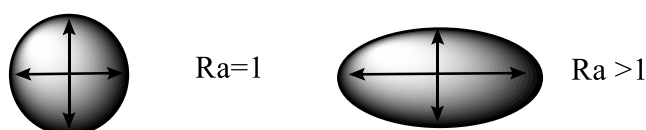


Figura S2. Esquema apresentando a influência da razão de aspecto na esfericidade da partícula

$$Ra = \frac{DM}{Dm} \quad (1)$$

Eq. S1 - Ra – Razão de Aspecto; DM – Diâmetro Maior; Dm – Diâmetro menor

Tabela S2. Valores correspondentes a razão de aspecto de 500 nanopartículas metálicas obtidos diretamente no software Digital Micrograph xx da Gatan.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1,033	1,177	1,067	1,032	1,167	1,035	1,053	1,050	1,018	1,022	1,155	1,034	1,507	1,011	1,121	1,022	1,010	1,071	1,063	1,000
2	1,125	1,108	1,020	1,056	1,195	1,055	1,008	1,048	1,025	1,066	1,024	1,050	1,068	1,049	1,069	1,196	1,052	1,001	1,032	1,090
3	1,068	1,009	1,031	1,021	1,032	1,023	1,069	1,057	1,035	1,071	1,054	1,118	1,049	1,009	1,012	1,023	1,041	1,058	1,098	1,016
4	1,050	1,059	1,106	1,094	1,007	1,116	1,192	1,018	1,024	1,122	1,045	1,090	1,099	1,209	1,194	1,018	1,000	1,108	1,073	1,100
5	1,024	1,192	1,019	1,008	1,008	1,067	1,094	1,118	1,042	1,157	1,046	1,047	1,096	1,054	1,067	1,022	1,063	1,058	1,055	1,050
6	1,049	1,036	1,052	1,062	1,088	1,043	1,032	1,022	1,061	1,092	1,086	1,037	1,103	1,043	1,137	1,016	1,068	1,119	1,087	1,068
7	1,030	1,176	1,033	1,062	1,052	1,039	1,040	1,046	1,143	1,324	1,039	1,051	1,011	1,024	1,083	1,000	1,038	1,015	1,058	1,116
8	1,057	1,088	1,038	1,133	1,833	1,025	1,009	1,015	1,173	1,154	1,230	1,017	1,070	1,026	1,123	1,036	1,105	1,121	1,030	1,032
9	1,069	1,142	1,053	1,029	1,060	1,029	1,040	1,056	1,093	1,001	1,082	1,156	1,007	1,021	1,027	1,268	1,024	1,322	1,052	1,077
10	1,049	1,034	1,088	1,050	1,300	1,242	1,009	1,045	1,090	1,040	1,063	1,086	1,011	1,038	1,055	1,024	1,057	1,020	1,119	1,076
11	1,010	1,012	1,022	1,040	1,055	1,036	1,099	1,124	1,223	1,091	1,138	1,106	1,069	1,032	1,007	1,081	1,050	1,023	1,011	1,091
12	1,048	1,024	1,013	1,025	1,063	1,083	1,065	1,017	1,083	1,046	1,030	1,242	1,033	1,078	1,000	1,083	1,017	1,239	1,104	1,069
13	1,065	1,012	1,022	1,129	1,013	1,128	1,079	1,029	1,005	1,005	1,038	1,107	1,020	1,047	1,073	1,051	1,019	1,181	1,119	1,152
14	1,118	1,039	1,057	1,089	1,089	1,076	1,012	1,073	1,070	1,085	1,018	1,031	1,116	1,118	1,095	1,073	1,030	1,026	1,143	1,024
15	1,037	1,091	1,061	1,025	1,090	1,079	1,060	1,240	1,251	1,110	1,031	1,206	1,019	1,018	1,002	1,015	1,031	1,099	1,114	1,052
16	1,064	1,099	1,085	1,007	1,035	1,042	1,008	1,028	1,099	1,023	1,120	1,032	1,006	1,046	1,150	1,041	1,052	1,030	1,008	1,005
17	1,057	1,075	1,037	1,060	1,065	1,124	1,103	1,162	1,208	1,058	1,039	1,015	1,150	1,052	1,019	1,000	1,011	1,069	1,131	1,054
18	1,079	1,003	1,014	1,025	1,067	1,051	1,027	1,012	1,030	1,032	1,109	1,090	1,020	1,116	1,031	1,046	1,026	1,058	1,001	1,036
19	1,025	1,109	1,009	1,234	1,004	1,031	1,101	1,062	1,047	1,070	1,033	1,060	1,105	1,079	1,060	1,006	1,078	1,021	1,104	1,080
20	1,005	1,199	1,031	1,016	1,019	1,076	1,072	1,056	1,056	1,061	1,091	1,088	1,017	1,046	1,015	1,017	1,139	1,018	1,102	1,000
21	1,034	1,013	1,121	1,048	1,103	1,100	1,128	1,028	1,081	1,083	1,003	1,028	1,032	1,009	1,079	1,006	1,208	1,079	1,046	1,101
22	1,062	1,008	1,061	1,007	1,008	1,070	1,058	1,087	1,054	1,091	1,036	1,056	1,043	1,034	1,113	1,051	1,364	1,013	1,094	1,007
23	1,007	1,028	1,018	1,071	1,241	1,073	1,332	1,054	1,014	1,199	1,079	1,025	1,028	1,014	1,106	1,043	1,006	1,052	1,002	1,088
24	1,167	1,026	1,021	1,018	1,017	1,055	1,206	1,118	1,007	1,099	1,066	1,027	1,016	1,030	1,172	1,110	1,035	1,029	1,003	1,054
25	1,054	1,052	1,021	1,202	1,025	1,111	1,063	1,079	1,109	1,065	1,165	1,094	1,092	1,010	1,050	1,028	1,066	1,008	1,005	1,066

Média Final = 1,069

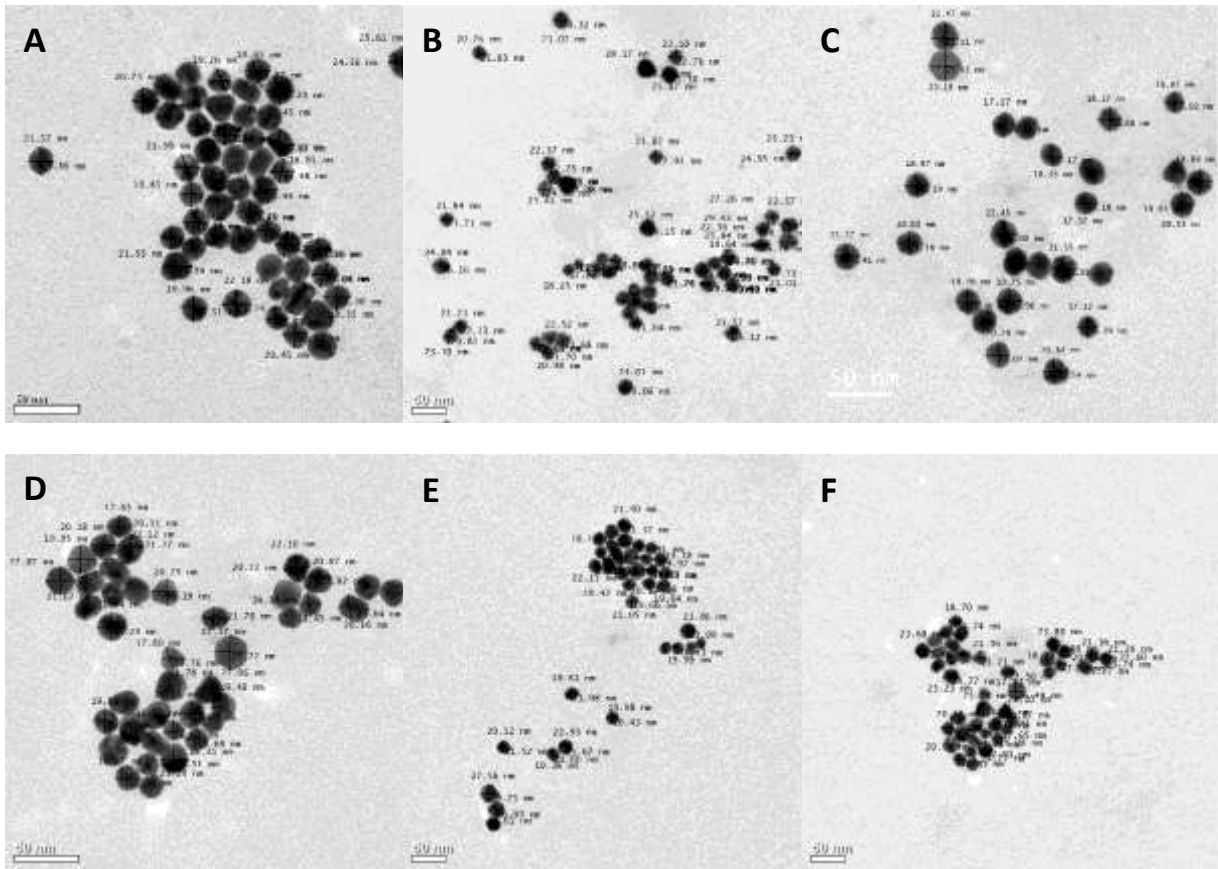


Figura S3. Exemplos de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão utilizadas para cálculo da determinação de razão de aspecto utilizando o software Digital micrograph. Os valores correspondentes ao diâmetro maior e menor são identificados nas imagens. A, B, C, D,E,F scale bar 50 nm.

Artigo IV

Conjugação covalente de anticorpos com nanopartículas de ouro para aumento da sensibilidade na detecção do 17 β estradiol

Resumo

O uso de nanomateriais com anticorpos têm atraído recentemente um grande interesse, principalmente por causa do seu uso potencial como sistemas de entrega de drogas específicas e em aplicações de diagnóstico. Um grande esforço tem sido feito ao longo dos anos para o desenvolvimento de nanobioconjugados para serem utilizados como sondas ópticas. Embora muitas abordagens tenham sido relatadas nesse sentido, a bioconjugação controlada de anticorpos ainda é um desafio. Neste artigo as estratégias de bioconjugação são discutidas com o objetivo de avaliar a melhor estratégia de acoplamento de anticorpos na superfície de nanomateriais de forma orientada. Nós utilizamos os métodos de acoplamento por interação eletrostática (adsorção física) e conjugação covalente na orientação de anticorpos na superfície metálica e a sua influência na detecção do 17 β -estradiol por Ressonância Plasmonica de Superfície Localizada. O entendimento destes mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de bioconjugados inorgânicos reprodutíveis com superfície orientada.

1. INTRODUÇÃO

Devido à sua elevada especificidade e grande diversidade, os anticorpos (Ac) são uma das biomoléculas mais utilizadas para fornecer especificidade e bioatividade em nanopartículas (NP's), principalmente para aplicações em biosensores, entrega de drogas e sondas para marcação em imagiologia [1-6]. Recentemente, com avanços em biotecnologia, é possível produzir anticorpos em larga escala em vários sistemas biológicos contra praticamente qualquer alvo [7]. No entanto, apesar da aparente importância dessas moléculas para sistemas nanoparticulados, a preparação e otimização de bioconjugados reprodutíveis são fatores limitantes para o seu progresso em aplicações biotecnológicas.

Numerosos métodos físico-químicos têm sido propostos para acoplar e funcionalizar vários tipos de NP's com anticorpos [8-25]. Um desses métodos envolve a adsorção iônica que ocorre em um pH de complexação próximo ao ponto isoelétrico (pI) do anticorpo. Embora apresente desvantagens como fraca reprodutibilidade, orientação aleatória e baixa estabilidade em diferentes condições de pH, Puertas et al (2011) [26] relataram bons resultados na orientação de anticorpos. Evidenciando que os planos de interação dos anticorpos com a superfície metálica não afetam a porção de ligação ao antígeno (Fab), devido a distribuição de carga líquida e a assimetria do anticorpo.

Outro método de bioconjugação envolve a modificação da superfície de nanopartículas com grupos reativos, tais como grupos carboxila e amina que podem ser acoplados covalentemente a grupamento lateral de aminoácidos na superfície do anticorpo, utilizando métodos de bioconjugação padronizados, como por exemplo, EDC / NHS [27]. Embora esse seja o método mais amplamente difundido pelo fato de apresentar alta estabilidade e de estar ligado covalentemente a superfície metálica, alguns autores relataram agregação e polimerização [28]. Além disso, pode haver orientação aleatória do anticorpo sobre a superfície da nanopartícula de tal modo que os sítios de ligação do antígeno podem não serem acessíveis [26, 29,30].

Desta forma, procuramos investigar a melhor estratégia quanto a eficiência de conjugação e orientação dos anticorpos na superfície metálica utilizando as duas estratégias discutidas. Os ensaios de bioconjugação foram realizados com anticorpos do tipo IgG anti 17 β estradiol. A ligação orientada foi determinada utilizando um anticorpo secundário anti-Fab

Alexa Fluor 750 por fluorescência e *imunogold* anti Fab. Por fim, analisamos quantitativamente a eficiência dos nanoconjugados na detecção do 17 β estradiol pela ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) comparando com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2. EXPERIMENTAL

2.1 Materiais

O ácido tetracloroáurico (G4022), citrato trissódico (PHR1416), 16-ácido mercaptohexadecanóico (MUA) (448303), polietilenoglicol (PEG) (729159), 17 β estradiol (E-2257) n-hidroxisuccinamida (NHS) (130672) e o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (E6383) foram de pureza analítica e adquiridos da Sigma Aldrich. O anticorpo primário do tipo IgG1 Anti-17 β estradiol (ab20626) e o anticorpo secundário marcado com fluoróforo (Alexa Fluor 750) anti Fab de IgG1(ab175740) foram adquiridos pela Abcam. Para limpeza das vidrarias foi utilizada água régia (HCl 3: 1 HNO₃) preparada a fresco e usada dentro de 1 hora.

2.2 Instrumentos

As propriedades ópticas foram avaliadas por espectrofotometria de UV-vis (FEMTO 800 XI). O tamanho e morfologia das nanopartículas de ouro foram examinados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando um microscópio da JEOL, modelo JEM1400 operado a 120KV com filamento de hexaboreto de lantânio (LAB6). A natureza cristalina das AuNP's foi confirmada por difratometria de raios-x (DRX) usando o Difractômetro D8 – ADVANCE (BRUKER – AXS). A concentração total de nanopartículas foi determinada usando plasma indutivamente acoplado a um espectrômetro de massas (ICP-MS) da Perkin Elmer modelo Optima 7000, USA. A confirmação da funcionalização do ligante (MUA) foi investigada pela absorção na região do Infravermelho (FT-MIR FTLA 2000 Bomem), espectroscopia Raman (ALPHA 300R Raman Spectrometer). O detector de fluorescência da Varioskan Flash (Thermo Scientific) foi utilizado para as quantificações de anticorpos primários (excitação em 280 nm e com varredura da emissão de 300 a 500 nm) e secundários (excitação em 750 nm e com varredura da emissão de 770

a 840 nm). O sistema cromatográfico utilizado para detecção do 17 β estradiol foi o modelo Shimadzu CBM-20A, composto por um degaseificador DGU-20AS, uma bomba LC-20AT, um injetor automático SIL-20AHT e um forno CTO-20A. A água ultrapura para todos os ensaios e preparos de solução foi obtida pelo sistema de ultrapurificação EASYpure II® Thermo Scientific.

2.3 Softwares

O Origin Pro 8.5 versão livre e GraphPad Prism versão 6.01 foram utilizados para a elaboração dos gráficos de UV-Vis, Fluorescência e CLAE, bem como para a análise estatística. O *Software* Chemdraw Prime (cortesia Perkin Elmer) foi utilizado para a criação dos esquemas ao longo do texto.

2.4 Síntese e caracterização de AuNP's

A síntese foi realizada de acordo com a otimização para controle de tamanho já descrito por nosso grupo [31]. Resumidamente, 15 mL de HAuCl₄ a 2,5x10⁻⁴ M reagiram com 1mL de citrato de sódio 1% por 15 minutos a 100°C. Após este tempo, o coloide foi resfriado em banho de gelo e depois submetido à centrifugação (16.873 g, 20min) (*MiniSpin* 5418, *Eppendorf*). Três lavagens foram realizadas para remoção das substâncias que não reagiram. O material foi caracterizado por UV-Vis, MET, XRD.

2.5 Conjugação de AuNP's com Anticorpos

Para a conjugação de anticorpos na superfície metálica das AuNP's, duas estratégias foram avaliadas: (i) conjugação direta dos anticorpos por atração eletrostática; (ii) modificação da superfície metálica das NP's para o acoplamento covalente de anticorpos.

Conjugação direta dos anticorpos por atração eletrostática

As NP's foram lavadas e ressuspensas em água ultrapura com pH modificado para o pH de complexação (8,5) que é o pI de uma proteína do tipo IgG. Após esta etapa, 2.8 μ g do anticorpo anti-17 β estradiol foram adicionados em 100 μ L do coloide de ouro e mantido sob agitação orbital de 100 rpm à 25°C durante 30 minutos. Por fim, o material foi

centrifugado (16.873, 20 min) e o *pellet* foi ressuspendido em 100 μ L de PEG (1%) em água ultrapura.

Modificação da superfície metálica das NP's para o acoplamento covalente de anticorpos

As NP's foram funcionalizadas com o ligante tiolado mercaptohexadecanóico (MUA), com 11 átomos de carbono entre o grupo COOH e SH. Para a funcionalização das AuNP's, 100 μ L de 10 mM em etanol do ligante foi adicionado a 1 mL de solução de nanopartículas de ouro durante 100h a 800rpm a 25°C. As nanopartículas modificadas foram lavadas 3 \times por centrifugação (16.873 g, 20 min) sendo depois ressuspendidas em água ultrapura. A bioconjugação foi realizada mediante a utilização do método EDC/NHS, cujas condições experimentais foram previamente otimizadas pelo nosso grupo de pesquisa [32]. Assim, foi adicionado em 100 μ L das nanopartículas com a superfície modificada com o ligante (MUA), 10 μ L do EDC (50 μ M) por 30 minutos e em seguida adicionou-se 10 μ L do NHS (75 μ M) e deixou a mistura sob agitação orbital por 30 minutos a 150 rpm. Após este período 2.8 μ g do anticorpo anti-17 β estradiol foi inserido no sistema deixando reagir por 30 minutos. O anticorpo foi imobilizado através dos seus grupos amino, formando uma ligação amida com ácido carboxílico previamente ativado (EDC/NHS). Por fim, o material foi centrifugado (16.873 g, 20 min) e o *pellet* foi ressuspendido em 100 μ L de PEG a 1% para funcionalização das áreas não cobertas por anticorpos.

2.6 Determinação do total de anticorpos ligados

A quantidade de anticorpos ligados às nanopartículas foi calculada pela subtração da concentração inicial menos a proteína livre detectada no sobrenadante por fluorescência (excitação em 280 nm e emissão em 350 nm).

2.7 Determinação da orientação dos anticorpos ligados

Para determinação da orientação dos anticorpos, nós utilizamos um anticorpo secundário marcado com fluoróforo (Alexa Fluor 750) anti Fab de IgG. Para esta etapa 4 μ g deste anticorpo foi adicionado a 100 μ L de cada um dos 2 nanobioconjugados avaliados. A quantidade de anticorpos orientados x não orientados na superfície das NP's foi calculada pela subtração da concentração inicial menos os anticorpos secundários livres no sobrenadante por fluorescência (excitação em 750 nm e emissão em 770 nm).

2.8 Detecção do 17 β estradiol por CLAE

Para a análise cromatográfica, foi utilizado com padrão de referência o 17 β estradiol. Os picos foram separados por gradiente crescente de acetonitrila, sob fluxo de 0,50 mL/min. O cálculo dos teores do hormônio foi realizado por estimativa da concentração por meio de curva analítica relacionando área e concentração. A separação do analito foi realizada em coluna analítica Kinetex TM C18 (100 x 2,1 mm; 2,6 μ ; 100Å) à 45°C. As fases móveis utilizaram água MilliQ (A) e acetonitrila (B) como solventes, previamente filtrados em membranas de PTFE (0,45 μ m; 47 mm, Millipore) e degaseificadas em banho de ultrassom (Limpsonic®). O volume de injeção foi de 10 μ L e a detecção realizada por detectores de arranjos de diodos – PDA (SPD-M20A) em comprimento de onda de 280 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese e caracterização de AuNP's

Nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio se apresentaram monodispersas com diâmetro médio de 18 nm CV < 10% conforme contagem de 500 partículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. No espectro de absorção óptica (Figura 1A) pode ser observado o pico plasmônico característico em 522 nm e a estreita largura de banda indica uma pequena variação de tamanhos do material sintetizado. A formação dos nanocristais também foi confirmada com a análise de raios-X (Figura 1B), tendo o pico (111) em 38,31° mais acentuado, indicando ser esta a orientação predominante. A distribuição de tamanhos e a forma esférica podem ser visualizadas na Figura 1 (C,D,E F). A concentração foi determinada por ICP-MS e os resultados foram de 27,4 mg/L de Au.

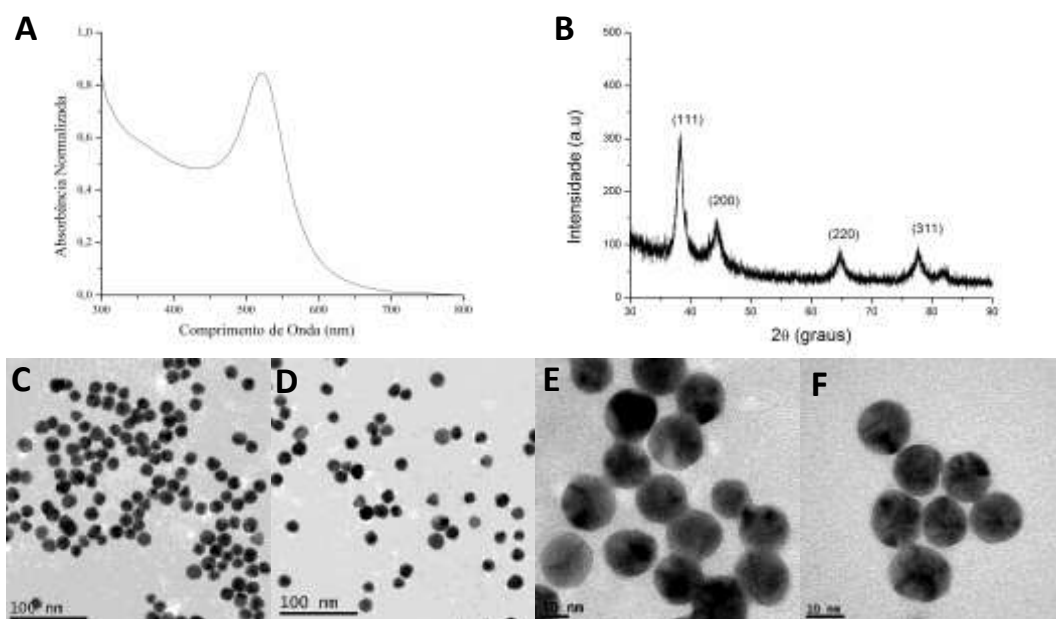


Figura 1 - Espectroscopia de absorção UV-Visível para o colóide de ouro sintetizado mostrando o pico plasmônico característico em 522 nm (A); Padrão de difração de raios-x, os picos característicos de nanocristais podem ser observados (B); Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão em diferentes magnificações mostrando o tamanho e a distribuição das nanopartículas sintetizadas. Barra de escala 100 nm (C,D) e 10 nm (E,F).

Nanopartículas funcionalizadas com MUA para acoplamento covalente

Foi realizado uma modificação da superfície metálica das NP's para o acoplamento covalente de anticorpos utilizando o ligante ácido mercaptoundecanóico (MUA). A funcionalização das AuNP's com esse ligante foi avaliada por absorção óptica (UV-Vis), absorção na região do Infra-Vermelho e espalhamento Raman, conforme pode ser visto em detalhes na Figura 2.

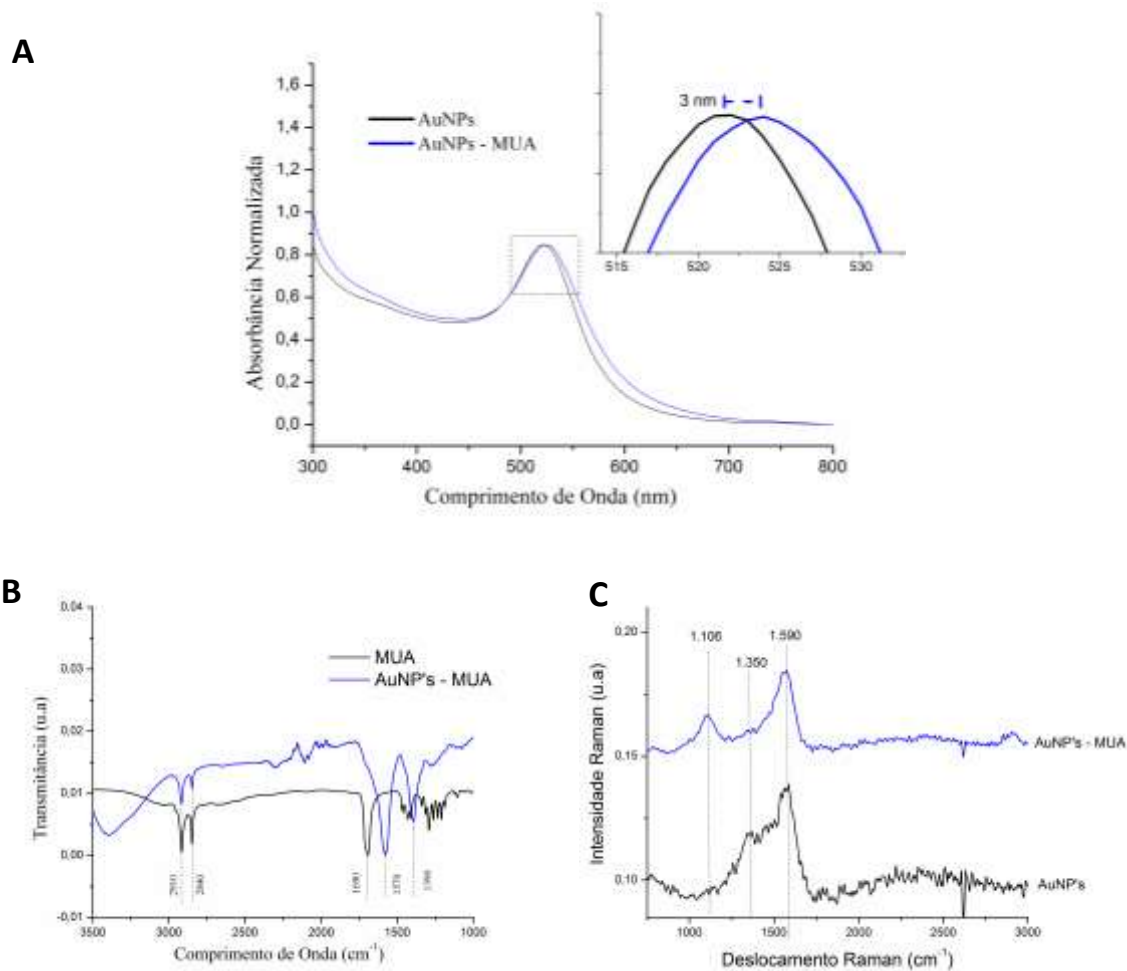


Figura 2 – Espectroscopia de absorção UV/Vis normalizada de AuNP's em preto e AuNP's funcionalizadas com ácido mercaptoundecanóico (MUA) em azul (A). O detalhe na figura apresenta o deslocamento da banda provocado pela ligação do MUA com a superfície do metal; Espectro de Infra-Vermelho do ligante utilizado (MUA) e das AuNP's funcionalizadas apresentando os picos característicos sobrepostos (B); Espectro Raman de AuNP's (preto) e AuNP's-MUA (azul) com os picos correspondentes a vibrações simétricas e assimétricas do citrato para AuNP's controle (preto) e o aparecimento de um pico em 1106 cm^{-1} referente a uma vibração S-C para AuNP's-MUA (C).

3.2 Conjugação de AuNP's com Anticorpos

Para a construção do sistema de detecção sensível utilizando anticorpos conjugados com nanopartículas de ouro, a concentração mínima de anticorpos adsorvidos à superfície metálica deve ser determinada. Para isso, a quantificação do total de anticorpos ligados foi mensurada pela fluorescência intrínseca da proteína, que pode ser atribuída à combinação da fluorescência dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina presentes na cadeia proteica do anticorpo. A excitação foi realizada em 280 nm e emissão foi varrida de 300 a

500 nm. O comprimento de onda de 350 nm foi utilizado para realização da curva padrão, conforme pode ser observado na Figura 3.

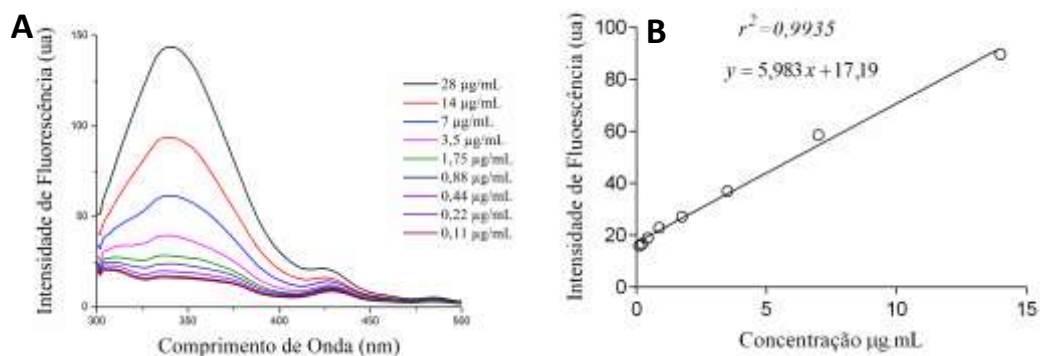


Figura 3 – Espectro de emissão de fluorescência na detecção da molécula do anticorpo primário do tipo IgG (Anti-17 β estradiol) com excitação de fótons realizada em 280 nm e varrimento da emissão de 290 a 500 nm (A); Curva padrão realizada utilizando λ 350 nm (emissão) das concentrações de 0,11 a 14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B).

Para confirmar que a região Fab dos anticorpos não foi envolvida durante a imobilização, a orientação dos anticorpos ligados a superfície metálica foi avaliada nos dois métodos de conjugação testados. Para isso, um anticorpo secundário capaz de reconhecer a porção Fab de IgG marcado com fluoróforo Alexa Fluor 750 foi utilizado. Todas as preparações Ac-AuNP's foram incubadas com um excesso do anticorpo secundário. Após a lavagem, a quantidade do Ac secundário ligado foi quantificado pela fluorescência do marcador Alexa Fluor 750, com excitação em 745 nm e emissão em 770 nm. Desta forma, a presença do anticorpo secundário na amostra, pode ser utilizada como medida direta para calcular a quantidade de ac primários orientados (porção Fab livre) durante a imobilização. A Figura 5 apresenta a curva padrão realizada para detecção do anticorpo secundário da amostra.

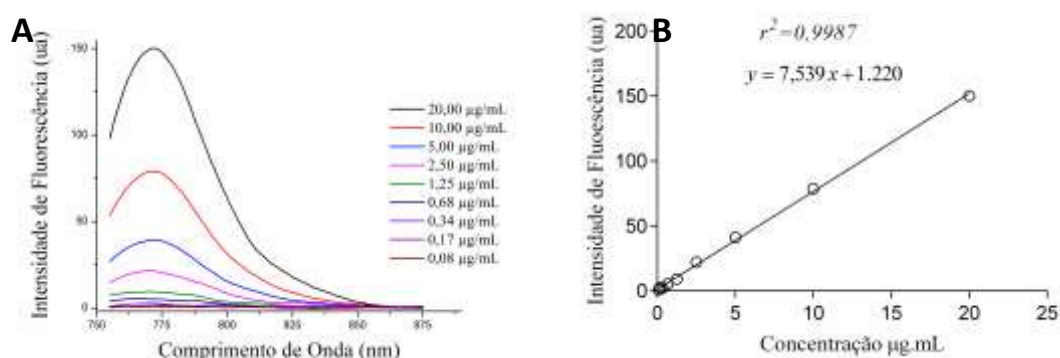


Figura 4 – Espectro de emissão de fluorescência na detecção da molécula do anticorpo secundário marcado com fluoróforo (Alexa Fluor 750) anti Fab de IgG com excitação em 745 nm e varrimento da emissão de 755 a 875 nm presente no sobrenadante (A); Curva padrão obtida em λ 770 nm (emissão) das concentrações de 0,08 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B).

Outro ponto importante a ser considerado na determinação da orientação dos anticorpos primários conjugados são as três possibilidades de interação com os Ac secundários apresentados na figura 6. As diferentes vias podem determinar a quantidade de Ac secundários presentes na superfície da amostra.

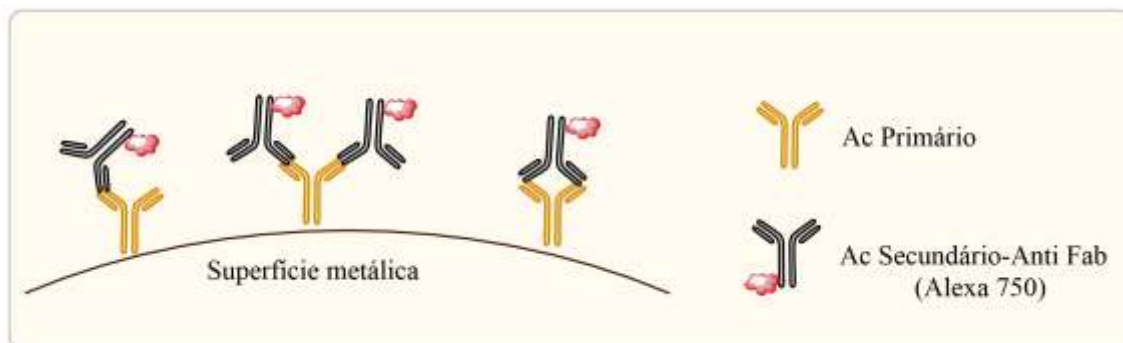


Figura 5. Possibilidades de reconhecimento da porção Fab pelo anticorpo secundário. O Ac pode se ligar a um sítio apenas ou aos dois sítios Fab de IgG simultaneamente, podendo haver as configurações ac primário: ac secundário (1:1 / 1:2).

O método de conjugação por adsorção física apresentou maior taxa de anticorpos ligados nas nanopartículas de ouro. No entanto, a taxa de orientação foi de apenas 38,2 % (Fig. 7). Este resultado confirma que as zonas de Fab de muitas moléculas estão envolvidas durante a imobilização, podendo desta forma reduzir a sua eficiência de reconhecimento do antígeno. Por outro lado, a densidade de anticorpos na superfície metálica, pode influenciar na disponibilidade da porção Fab. Visto que com esse aumento, a acessibilidade do antígeno espacial é reduzida. Isto é devido ao impedimento estérico entre anticorpos em estreita proximidade.

Para a conjugação covalente (Fig. 6), foi observada uma menor taxa de anticorpos conjugados. No entanto, a relação de Ac orientados foi de 84,7%, sendo expressivamente maior do que a dos anticorpos adsorvidos. Esse resultado sugere que o método de conjugação de anticorpos por meio da ligação covalente promove melhor orientação e provavelmente maior sensibilidade em aplicações de reconhecimento antígeno-anticorpo.

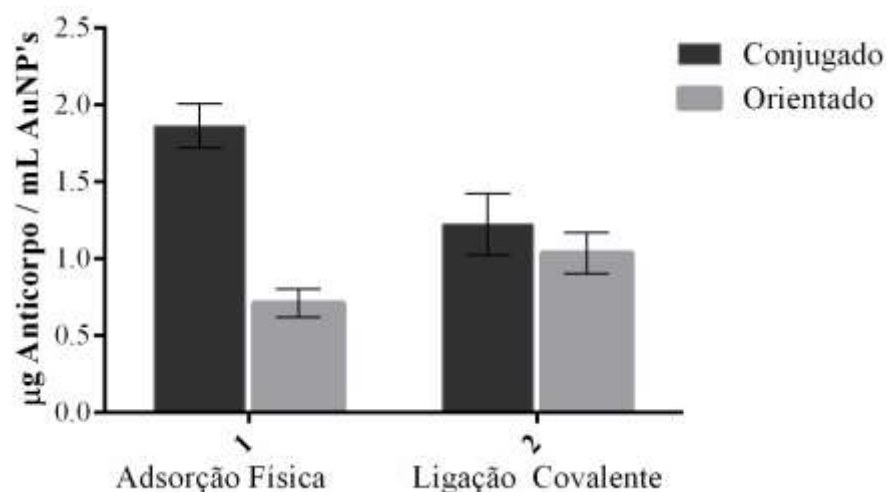


Figura 6. Comparação da quantidade de anticorpos anti-17β estradiol ligados com a quantidade de anticorpos orientados na superfície metálica das AuNP's pelas diferentes estratégias de conjugação avaliadas (Adsorção física e ligação covalente). A taxa de anticorpos ligados foi determinada pela fluorescência intrínseca dos aminoácidos presentes na estrutura dos anticorpos do tipo IgG (Excitação 280 / emissão 350 nm) e a taxa de anticorpos orientados foi determinada pelo uso de anticorpos secundários anti Fab Alexa Fluor 750.

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para avaliar qualitativamente a atividade biológica dos imunocombinados. Esta metodologia foi recentemente utilizada por Chou et al. [33] e Fernandez [34] a fim de produzir superestruturas de nanopartículas para entrega biológica controlada e para a determinação da orientação de anticorpos. Para isso, anticorpos secundários anti Fab marcados com uma NP de ouro de 5 nanômetros (*imunogold*) foram utilizados a fim de reconhecer os epítomos disponíveis dos anticorpos primários na superfície metálica. A Figura 7 apresenta uma ilustração desta interação.

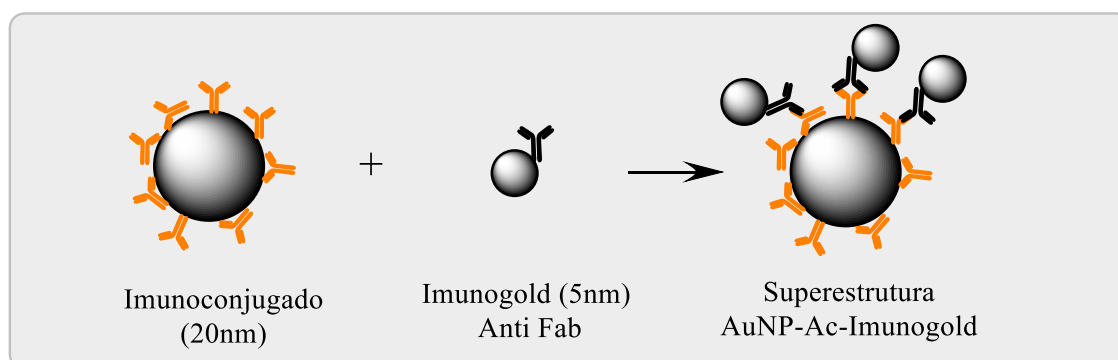


Figura 7. Ilustração descrevendo a formação de superestruturas com nanopartículas de ouro envolvendo o reconhecimento da porção Fab do anticorpo primário ancorado na superfície metálica por meio de um anticorpo secundário anti Fab de IgG marcado com uma nanopartículas de ouro 5nm.

Com base neste princípio, os bioconjugados produzidos pelas duas estratégias foram avaliados. As estruturas produzidas por adsorção física mostraram a média de 4,5 anticorpos disponíveis por NP (Fig. 8). É válido lembrar que este é apenas um método qualitativo, podendo apresentar outros marcadores ancorados no bioconjugado tridimensionalmente. Na conjugação covalente (Fig. 8), nota-se um maior número de anticorpos disponíveis para reconhecimento, aproximadamente 6,5 por NP, confirmando os resultados obtidos pela marcação com fluorescência discutidos anteriormente. A caracterização desses sistemas por MET revelou a formação bem sucedida de superestruturas, confirmando o reconhecimento entre o Fab anti-IgG (Imunogold) e o anti-17 β estradiol, bem como comprovando que a os bioconjugados retêm a sua atividade biológica.

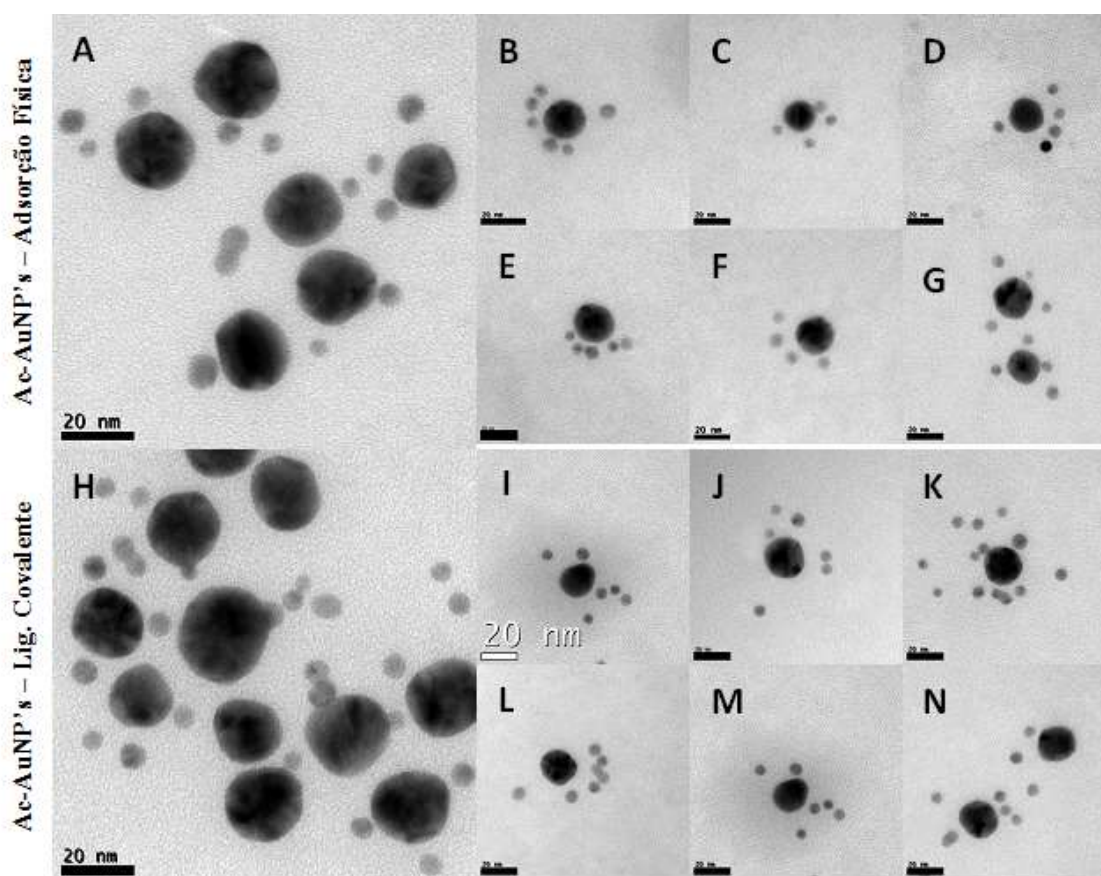


Figura 8 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão apresentando várias combinações possíveis de acordo a orientação do anticorpo primário ancorado na superfície metálica. As superestruturas são formadas por meio do reconhecimento de sítios Fab pelo imunogold (5nm). Imunoconjugados preparados por adsorção física (A-G) e imunoconjugados preparados por conjugação covalente por meio do ligante ácido mercaptoundecanóico (H-N).

3.3 Detecção do 17 β estradiol por LSPR

Para verificar a aplicabilidade dos imunocombinados, bem como suas diferenças em ensaios de diagnóstico, os combinados produzidos pelas duas estratégias de combinação foram avaliados para detecção 17 β -estradiol utilizando a ressonância plasmônica de superfície. Para isso, 100 μ L do coloide contendo cada um dos bioconbinados foi incubado com diferentes concentrações de 17 β -estradiol durante 5 min e, em seguida, teve suas propriedades ópticas avaliadas por um espectrofotômetro (400 a 700 nm). Como mostrado na Figura 9, com a concentração crescente do 17 β -estradiol, a solução teve um deslocamento do comprimento de onda máximo para o vermelho (redshift) para ambos os combinados avaliados, isto porque houve um aumento da quantidade de moléculas orgânicas ancoradas as NP's, levando ao deslocamento para comprimentos de ondas maiores. É interessante destacar que para o sistema preparado por adsorção física, as mudanças são detectadas a partir de 500 ng.mL⁻¹ do hormônio 17 β -estradiol, porém para o combinado com maior número de anticorpos orientados (combinação covalente) esta detecção ocorre em 200 ng.mL⁻¹. Isso significa que a sensibilidade seja melhorada em cerca de 2,5 vezes com o imunocombinado produzido por ligação covalente. Uma razão para a sensibilidade aumentada pode atribuir-se à maior concentração de anticorpos orientados, e devido à criação de mais pontos de contato na superfície das AuNP's. A relação linear do deslocamento do λ máx versus a concentração 17 β -estradiol indica que a concentração 17 β -estradiol pode ser quantitativamente detectada.

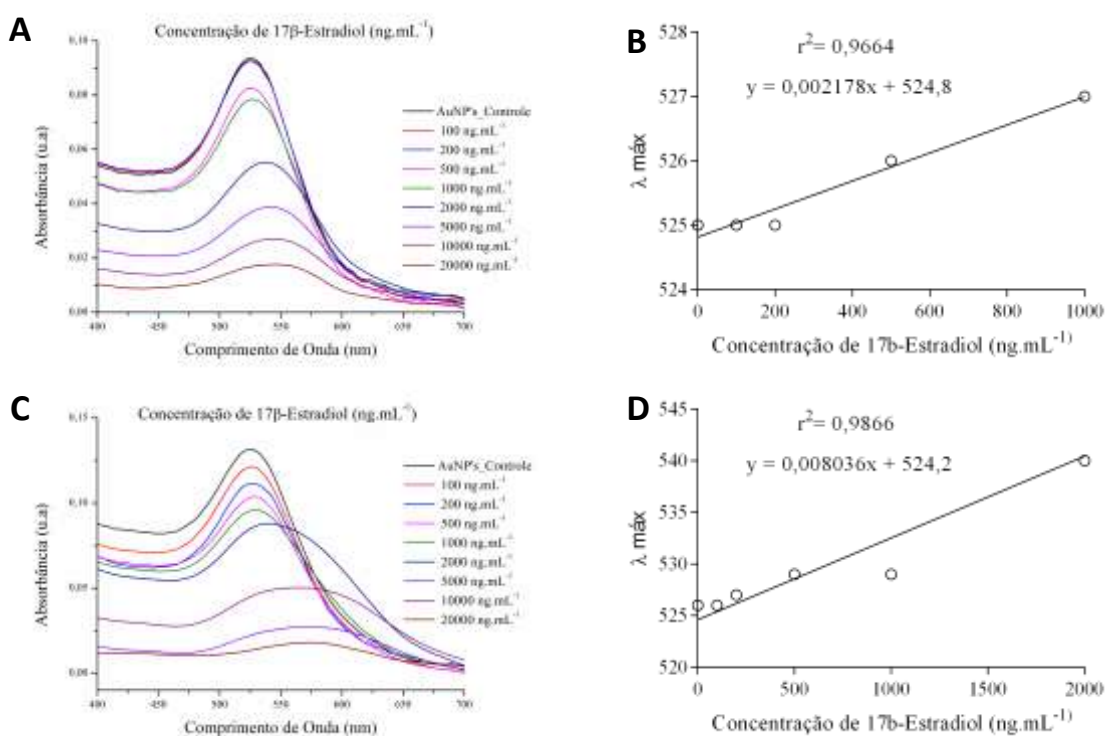


Figura 9 – Espectros de absorção das soluções de AuNP's conjugadas por adsorção física com anticorpos anti-17β estradiol sob diferentes concentrações de 17 β –estradiol (A); Curva de calibração típica para detecção do 17β-estradiol com imunoconjugados preparados por adsorção física (B); Espectros de absorção das soluções de AuNP's conjugadas por ligação covalente com anticorpos anti-17β estradiol sob diferentes concentrações de 17 β –estradiol (C); Curva de calibração típica para detecção do 17β-estradiol com imunoconjugados preparados com o uso de ligantes para a conjugação covalente (D).

A evolução do deslocamento do λ máximo para os dois sistemas avaliados é apresentada na Figura 10. Nota-se que para o conjugado produzido pela adsorção física há uma saturação em torno de 5000 ng.mL^{-1} , metade da concentração necessária para saturar o sistema sintetizado por conjugação covalente. Esta diferença encontrada pode ser atribuída a maior capacidade dos imunoconjugados (Lig. Covalente) de interagirem com o antígeno (17β-estradiol), visto que possuem uma maior disponibilidade de epitopos livres para ligação. Um outra observação é que para o bioconjugado de ligação covalente é verificado maiores deslocamentos para o vermelho, o que pode ser devido a maior esfera de coordenação promovida pelo uso dos ligantes para a conjugação covalente com os anticorpos.

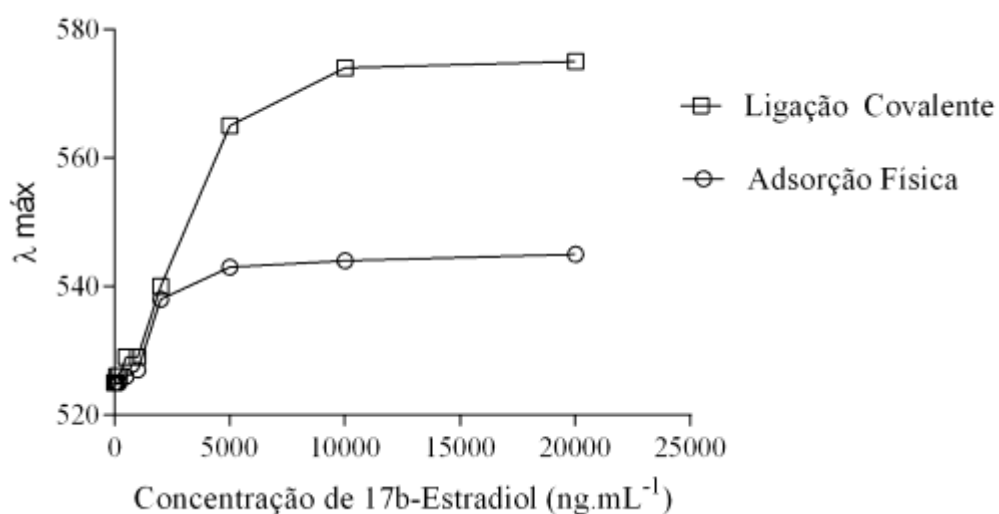


Figura 10. Comparação da evolução do deslocamento do lambda máximo (nm) em função do aumento da concentração de 17 β –estradiol (ng.mL⁻¹) para as diferentes estratégias de conjugação avaliadas (Adsorção física e ligação covalente). (B).

Ensaio com as mesmas concentrações do 17β-estradiol também foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para comparação com os imunoenaios avaliados neste trabalho. Os resultados podem ser verificados na Figura 11. Embora os dados tenham apresentado uma boa linearidade ($r^2=0,99$), a detecção por LSPR em ambos imunocombinados apresentaram níveis mais baixos de detecção.

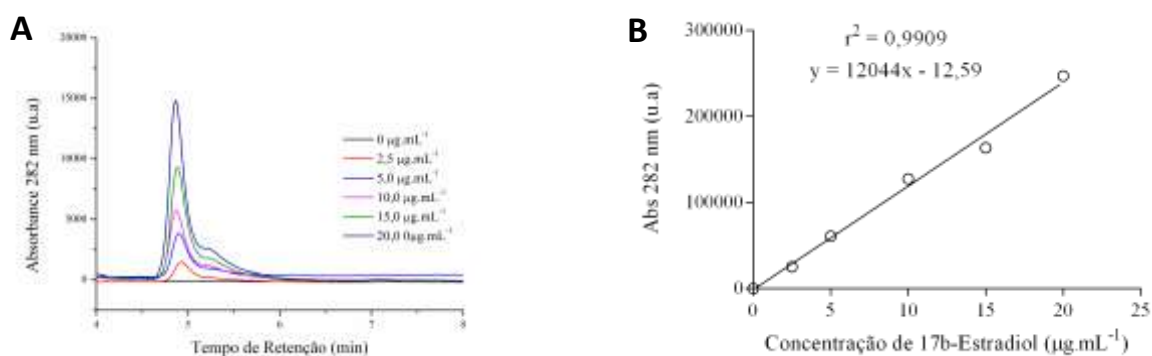


Figura 11. Cromatogramas obtidos na detecção do 17β-estradiol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (A) e curva padrão (B). Condições de operação: detector PDA 282 nm, Fluxo 0,5 mL/min, eluição isocrática H2O:ACN (60:40%).

Os resultados aqui obtidos mostraram que a orientação dos anticorpos na superfície metálica pode ser melhorada utilizando a estratégia de ligação covalente. A atividade biológica ou a capacidade de reconhecer o antígeno foi mantida após os ensaios de conjugação. O baixo rendimento na taxa de orientação pelo método de adsorção eletrostática pode indicar que as porções Fab podem estar envolvidas aleatoriamente ou não na conjugação com o metal.

A técnica de Ressonância Plasmonica de Superfície Localizada acoplada aos métodos de superfície orientada como mostrado na detecção do 17β -estradiol, apresenta um grande potencial para desenvolvimento e preparação de biossensores de afinidade, permitindo análise em tempo real de interações bio-específicas sem uso de marcadores. Além disso, devido a sua simplicidade, se torna um candidato potencial ao desenvolvimento de sistemas miniaturizados e portáteis capazes de realizar o diagnóstico de biomoléculas de maneira rápida e precisa.

4. CONCLUSÕES

A atividade de anticorpos imobilizadas em AuNP's é um equilíbrio de dois fatores: a densidade e orientação. Os resultados apresentados aqui demonstram que a maximização da quantidade de Ac não é tão vantajoso como frequentemente assumido na literatura. Foi evidenciado que a orientação dos anticorpos pode ser melhorada utilizando a estratégia de ligação covalente. Além disso, apresentamos a aplicabilidade dos imuconjugados para a detecção do 17β estradiol utilizando LSPR. A metodologia proposta pode ser aprimorada para utilização em nanodispositivos mais sensíveis, seletivos e de baixo custo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - P.A. McCarron, S.A. Olwill, W.M.Y. Marouf, R.J. Buick, B. Walker, C.J. Scott. Antibody conjugates and therapeutic strategies. *Mol. Interv.*, 5 (6) (2005), pp. 368–380
- 2 Hughes, D. Immunogold Probes in Light Microscopy. In *Methods in Molecular Biology*; Burns, R., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005; pp 173– 192.
- 3 Hermann, R.; Walther, P.; Mueller, M. Immunogold Labeling in Scanning Electron Microscopy *Histochem. Cell Biol.* 1996 106 31 39
- 4 Wooding, F. B. P.; Kendall, M. D. Immunogold Methods for Electron Microscopy *Methods. Immunol. Anal.* 1993 3 314 337
- 5 Verkleij, A. J.; Koster, A. J.; Muller, W. H.; Humbel, B. M. Immuno-Gold Labeling in Transmission Electron Microscopy *NATO ASI Ser. A, Life Sci.* 1999 309 339 356
- 6 Hainfeld, J. F.; Powell, R. D. New Frontiers in Gold Labeling *J. Histochem. Cytochem.* 2000 48 471480
- 7 Jose-Maria Montenegro, Valeria Grazu, Alyona Sukhanova, Seema Agarwal, Jesus M. de la Fuente, Igor Nabiev, Andreas Greiner, Wolfgang J. Parak. Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2013,65:677–688
- 8 E. Garber, K. Venkateswaran, T. O'Brien. Simultaneous multiplex detection and confirmation of the proteinaceous toxins abrin, ricin, botulinum toxins, and Staphylococcus enterotoxins A, B, and C in food. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010), pp. 6600–6607
- 9 A. Williams, G. Galfre, C. Milstein. Analysis of cell-surfaces by xenogeneic myeloma-hybrid antibodies — Differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell*, 12 (1977), pp. 663–673
- 10 M. DeLisa, Z. Zhang, M. Shiloach, S. Pilevar, C. Davis, J. Sirkis, W. Bentley. Evanescent wave long period fiber Bragg grating as an immobilized antibody biosensor. *Anal. Chem.*, 72 (2000), pp. 2895–2900
- 11 V. Popii, G. Baumann. Laboratory measurement of growth hormone. *Clin. Chim. Acta*, 350 (2004), pp. 1–16
- 12 W. Yin, J. Liu, T. Zhang, W. Li, W. Liu, M. Meng, F. He, Y. Wan, C. Feng, S. Wang, X. Lu, R. Xi. Preparation of monoclonal antibody for melamine and development of an indirect competitive ELISA for melamine detection in raw milk, milk powder, and animal feeds. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010), pp. 8152–8157
- 13 X. Ai, B. Butts, K. Vora, W. Li, C. Tache-Talmadge, A. Fridman, H. Mehmet. Generation and characterization of antibodies specific for caspase-cleaved neo-epitopes: a novel approach. *Cell Death Dis.*, 2 (2011)
- 14 A. Singh, D. Senapati, S. Wang, J. Griffin, A. Neely, P. Candice, K. Naylor, B. Varisli, J. Kalluri, P. Ray. Gold nanorod based selective identification of *Escherichia coli* bacteria using two-photon Rayleigh scattering spectroscopy. *ACS Nano*, 3 (2009), pp. 1906–1912
- 15 M. Pavao, A. Traish. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor alpha and beta. *Steroids*, 66 (2001), pp. 1–16
- 16 Allen, T. M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2 (10), 750–763.
- 17 Yu, M. K., Park, J., and Jon, S. (2012) Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics* 2 (1), 3–44.

- 18 Davis, M. E., Chen, Z., and Shin, D. M. (2008) Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* 7 (9), 771–782.
- 19 Al-Jamal, W.T., Al-Jamal, K. T., Tian, B., Lacerda, L., Bornans, P. H., Frederik, P. M., and Kostarelos, K. (2008) Lipid-quantum dot bilayer vesicles enhance tumor cell uptake and retention in vitro and in vivo. *ACS Nano* 2 (3), 408–418.
- 20 Jung, Y.; Jeong, J. Y.; Chung, B. H. Recent Advances in Immobilization Methods of Antibodies on Solid Supports *Analyst*. 2008, 133, 697–701
- 21 Derwinska, K.; Sauer, U.; Preininger, C. Adsorption versus Covalent, Statistically Oriented and Covalent, Site-Specific IgG Immobilization on Poly(vinyl alcohol)-Based Surfaces *Talanta* 2008, 77, 652–658
- 22 Jung, Y.; Lee, J. M.; Kim, J. W.; Yoon, J.; Cho, H.; Chung, B. H. Photoactivable Antibody Binding Protein: Site-Selective and Covalent Coupling of Antibody *Anal. Chem.* 2009, 81, 936–942
- 23 Ikeda, T.; Hata, Y.; Ninomiya, K. I.; Ikura, Y.; Takeguchi, K.; Aoyagi, S.; Hirota, R.; Kuroda, A. Oriented Immobilization of Antibodies on a Silicon Wafer Using Si-Tagged Protein A *Anal. Biochem.* 2009, 385, 132–137
- 24 Moser, A. C.; Hage, D. S. Immunoaffinity Chromatography: An Introduction to Applications and Recent Developments *Bioanalysis* 2010, 2, 769–790
- 25 Kausaitė-Minkstienė, A.; Ramanavičienė, A.; Kirlyte, J.; Ramanavicius, A. Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor *Anal. Chem.* 2010, 82, 6401–6408
- 26 Sara Puertas, Pilar Batalla, María Moros, Ester Polo, Pablo del Pino, José M. Guisán, Valeria Grazú, Jesús M. de la Fuente. Taking Advantage of Unspecific Interactions to Produce Highly Active Magnetic Nanoparticle–Antibody Conjugates. *ACS Nano*, 2011, 5 (6), pp 4521–4528
- 27 Sperling RA, Parak WJ. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A*. 2010, 368, 1333–1383.
- 28 Chloe Kim, Justin F. Galloway, Kwan Hyi Lee, and Peter C. Searson. Universal Antibody Conjugation to Nanoparticles Using the Fcγ Receptor I (FcγRI): Quantitative Profiling Of Membrane Biomarkers. *Bioconjugate Chem.*, 2014, 25 (10), pp 1893–1901
- 29 Yu, M. K., Park, J., and Jon, S. (2012) Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy *Theranostics* 2 (1) 3–44
- 30 Petryayeva, E., Algar, W. R., and Medintz, I. L. (2013) Quantum dots in bioanalysis: a review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging *Appl. Spectrosc.* 67 (3) 215–252
- 31 Ver artigo I desta tese
- 32 Ver artigo III desta tese
- 33 Leo Y. T. Chou, Kyril Zagorovsky & Warren C. W. Chan. DNA assembly of nanoparticle superstructures for controlled biological delivery and elimination. *Nature Nanotechnology* 9, 148–155 (2014)
- 34 Lorena García Fernández. Introducing gold nanoparticle bioconjugates within the biological machinery. PhD Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona. 2013