



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

CLARICE EMILIA DA SILVEIRA

**Estudo da conjugação de nanopartículas de ouro (AuNP)
com fluoróforos orgânicos derivados do
borodipirrometeno (BODIPY)**

VITÓRIA, ES

2021

Clarice Emília da Silveira

**Estudo da conjugação de nanopartículas de ouro (AuNP)
com fluoróforos orgânicos derivados do
borodipirrometeno (BODIPY)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador(a): Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende

Co-orientador(a): Dr. Jairo Pinto de Oliveira

VITÓRIA, ES

2021

Clarice Emilia da Silveira

“Estudo da conjugação de nanopartículas de ouro (AuNP) com fluoróforos orgânicos derivados do borodipirrometeno (BODIPY)”

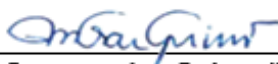
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovado(a) em 19 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende – Orientador



Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães – Examinador Interno



Prof. Dr. Flavio da Silva Emery – Examinador Externo

**Vitória/ES
2021**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

D111e Da Silveira, Clarice Emília, 1986-
Estudo da conjugação de nanopartículas de ouro (AuNP) com
fluoróforos orgânicos derivados do borodipirrometeno (BODIPY)
/ Clarice Emília Da Silveira. - 2021.
69 f. : il.

Orientador: Lucas Cunha Dias de Rezende.

Coorientador: Jairo Pinto de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Nanotecnologia. 2. Fluorescência. 3. BODIPY. 4.
Nanopartículas de ouro. I. Rezende, Lucas Cunha Dias de. II.
Oliveira, Jairo Pinto de. III. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pela força e sustento nos momentos mais difíceis. À minha mãe e irmãs, por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador, Professor Lucas, por todos os ensinamentos, paciência, disponibilidade, confiança, incentivo e amizade.

Ao Professor Jairo, que sempre esteve disponível para resolver qualquer problema e sanar todas as minhas dúvidas.

Ao Professor Marco, por todos os conselhos e conversas sobre os mais variados temas que sempre ajudavam a descontraír o ambiente do laboratório, me fazendo ver a docência e a pesquisa com outros olhos.

Aos colegas de turma e do Laboratório de Nanomateriais Funcionais, por dividirem as angústias e alegrias, durante esse tempo. Em especial a Ariany e Thais, a ajuda de vocês foi essencial para a elaboração de desse trabalho.

À UFES e ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia pela oportunidade.

Ao LUCCAR, ao IFES campus Serra e ao LabPetro, laboratórios parceiros que ajudaram da elaboração desse trabalho.

À

FAPES pelo financiamento do projeto.

RESUMO

A interação entre moléculas fluorescentes e nanopartículas metálicas tem despertado grande interesse devido aos seus potenciais aplicações como em detecção de íons metálicos, sensor de tióis intracelulares, detecção de inseticidas, imuno ensaios de fluorescência, medida da distância entre os sítios de ligação e medidas de pH intracelular. A presença de AuNPs pode alterar as propriedades fotofísicas dos compostos fluorescentes, aumentando, diminuindo e/ou desviando a emissão da fluorescência. O objetivo desse trabalho, foi desvendar a interação entre AuNPs e fluoróforos derivados de borodipirrometenos (BODIPYs). Para tal, foram utilizados nove fluoróforos e diferentes estratégias de conjugação, através de ligação eletrostática, covalente e com o uso de espaçador. Os dados parecem indicar que AuNPs se comportam como *quenchers*, ou seja, são capazes de suprimir a fluorescência dos compostos estudados. Neste estudo, desenvolvemos um método de funcionalização de AuNPs com BODIPYs, pois acreditamos na aplicação do material em nano e biossensores, nanotoxicologia, e em técnicas imunocromatográficas fluorescentes baseadas nas junções das propriedades ópticas e eletrônicas de AuNPs e compostos fluorescentes.

Palavras chaves: AuNPs, fluorescência, BODIPY, nanotecnologia

ABSTRACT

The interaction between fluorescent molecules and metallic nanoparticles has aroused great interest due to its potential applications in metal ion detection, intracellular thiol sensor, insecticide detection, fluorescence immunoassays, measurement of the distance between binding contacts and pH measurements intracellular. The presence of AuNPs can alter the photophysical properties of fluorescent compounds, increasing, decreasing and/or shifting the fluorescence emission. The objective of this work is to unravel an interaction between AuNPs and fluorophores derived from borodipyrromethenes (BODIPYs). For this purpose, nine fluorophores and different conjugation objectives were used, through electrostatic and covalent bonding and with the use of a spacer. The data seem to indicate that AuNPs behave like quenchers, that is, they are capable of suppressing the fluorescence of the studied compounds. In this study, we developed a method for the functionalization of AuNPs with BODIPYs, as we believe in the application of the material in nano and biosensors, nanotoxicology, and in fluorescent immunochromatographic techniques based on the junction of optical and electronic properties of AuNPs and fluorescent compounds.

Key-words: AuNPs, fluorescence, BODIPY, nanotechnology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de funcionalização superficial de nanopartículas.	15
Figura 2. Representação esquemática das oscilações de carga de superfície induzida causadas por um campo de luz externa e possíveis respostas espectroscópicas... 16	16
Figura 3. Representação da ressonância plasmônica de superfície.	17
Figura 4. Processos do fenômeno de luminescência.	19
Figura 5. Diagrama de Jablonski.	19
Figura 6. Exemplo de fluoróforos intrínsecos.	21
Figura 7. Exemplos de fluoróforos derivados de pequenas moléculas orgânicas. ...	22
Figura 8. Estrutura química do anel BODIPY.	22
Figura 9. A: Processo de síntese, pré e pós funcionalização dos BODIPYs. B: Estrutura do FITC C: Estrutura de BODIPY-isotiocianato desenvolvidos pelo grupo.	24
Figura 10. Mecanismo do FRET/NSET.	26
Figura 11. Mecanismo do MEF.	28
Figura 12. Reação da síntese das AuNPs.	31
Figura 13. Fórmula estrutural dos BODIPYs 1 a 6.	33
Figura 14. Fórmula estrutural do composto 7 e FITC.	34
Figura 15. Esquema da conjugação covalente com utilização de espaçador.	36
Figura 16. Caracterização espectroscópica das AuNPs.	40
Figura 17. Espectros de absorção no UV-Vis das AuNPs em diferentes solventes e em concentrações variadas (10,20,30,40 e 50%).	42
Figura 18. Parâmetro de floculação das AuNPs em diferentes solventes.	43
Figura 19. Espectro absorção e emissão dos compostos 1-7, Rodamina B e FITC livres.	46
Figura 20. Determinação do tempo de conjugação com Rodamina B.	48
Figura 21. Espectro de absorção dos conjugados com AuNP-Fluoróforo orgânico. 50	50
Figura 22. Espectroscopia Raman dos compostos 1-6 e rodamina B.	51
Figura 23. Espectroscopia de Fluorescência dos compostos 1-6 e rodamina B conjugados.	52
Figura 24. Esquema da transferência de energia por NSET.	53
Figura 25. Espectro UV-Vis AuNPs livres e conjugadas.	54
Figura 26. Espectroscopia de fluorescência das AuNPs conjugadas.	54

Figura 27. Espectro UV-Vis das AuNPs.....	55
Figura 28. Espectroscopia de fluorescência das AuNP-Cis conjugada.....	57
Figura 29. Espectroscopia Raman dos conjugados.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa do diâmetro das AuNPs por diferentes técnicas.	41
Tabela 2. Absorção e emissão máxima e desvio de Stokes dos compostos.	47
Tabela 3. Absorção e emissão dos fluoróforos livres e conjugados.....	49
Tabela 4. Espectro UV-Vis dos compostos 7 e FITC, livres e conjugados.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AuNPs – Nanopartículas de ouro

AuNP-Cis – Nanopartículas de ouro conjugadas com cisteamina

BODIPY – Boro-dipirrometeno

DLS – Espalhamento dinâmico de luz, do inglês *Dynamic light scattering*

DMF - Dimetilformamida

DMSO – Dimetil sulfoxido

FADH - flavina-adenina dinucleótido

FLIM- do inglês *fluorescence lifetime imaging*

FRET – Transferência de energia por ressonância de Foster, do inglês *Foster resonance energy transfer*

IFES – Instituto Federal do Espírito Santo

MEF – Fluorescência aumentada por metal, do inglês *Metal enhanced fluorescence*

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mV - milivolt

NADH - Dinucleótido de nicotinamida

NP - Nanopartículas

NSET – Nanosurface energy transfer

nm - Nanômetro

pH – potencial hidrogeniônico

DNA – Ácido desoxiribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

DMF – Dimetilformamida

Rpm - Rotação por minuto

RPS - Ressonância plasmônica de superfície

UV-Vis – Ultravioleta visível

λ - Lambda

τ – Tempo de vida de fluorescência

Φ_f - Rendimento quântico de fluorescência

mL – microlitro

Sumário

1) INTRODUÇÃO	12
2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 NANOTECNOLOGIA	13
2.1.1 Nanopartículas de Ouro.....	14
2.2 FLUORESCÊNCIA	17
2.2.1 Fluoróforos orgânicos	21
2.2.2 Derivados borodipirrometeno (BODIPY).....	22
2.3 CONJUGAÇÃO AuNPs-FLUORÓFOROS.....	24
2.3.1 Transferência de energia	25
2.3.2 Metal enhanced fluorescence (MEF)	27
2.3.3 Modificação da taxa de decaimento radiativo	28
3) OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4) MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 SÍNTESE DAS AUNPS	31
4.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS AUNPS.....	31
4.3 BIBLIOTECA DE FLUORÓFOROS ORGÂNICOS	32
4.4 CONJUGAÇÃO ELETROSTÁTICA DOS FLUORÓFOROS 1 A 6 COM AUNPS	34
4.5 CONJUGAÇÃO COVALENTE DO FLUORÓFORO 7 E FITC COM AuNPs... 35	
4.6 CONJUGAÇÃO COVALENTE UTILIZANDO CISTEAMINA COMO ESPAÇADOR	35
4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS PREPARADOS	36
4.7.1 Espectroscopia de UV-visível	37
4.7.2 Raio X.....	37

4.7.3 DLS (Dynamic Light Scatering).....	37
4.7.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	37
4.7.5 Potencial zeta	38
4.7.6 Espectroscopia de Raman.....	38
4.7.7 Espectroscopia de fluorescência	38
5) RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL AUNPS	39
5.2 EFEITO DOS CO-SOLVENTES SOBRE A ESTABILIDADE DAS AUNPS	41
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUORÓFOROS.....	43
5.4 CONJUGAÇÃO ELETROSTÁTICA AUNPS - FLUORÓFOROS 1 A 6.....	47
5.4.1 Determinação do tempo de conjugação com Rodamina B	47
5.4.2 Caracterização do conjugado	48
5.5 CONJUGAÇÃO COVALENTE AuNP COMPOSTO 7 E FITC.....	53
5.5.1 Caracterização do conjugado sem espaçador	53
5.5.2 Caracterização do conjugado usando cisteamina como espaçador	55
6) CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	59
7) REFERÊNCIAS.....	60

1) INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e domínio de novos materiais sempre fascinou a humanidade, estando intimamente ligados à história e evolução do mundo. Neste contexto, as nanopartículas de ouro (AuNPs), assim como o uso de técnicas fluorimétricas, ajudaram de certa forma nessa evolução, principalmente em seu uso como ferramentas analíticas. A interação entre moléculas fluorescentes e nanopartículas metálicas tem atraído grande interesse devido às suas inúmeras aplicações, como em detecção de íons metálicos¹, sensor de tióis intracelulares², detecção de inseticidas³, imuno ensaios de fluorescência^{4,5}, medida da distância entre os sítios de ligação⁶ e medidas de pH intracelular⁷.

Essa interação, pode alterar as propriedades fotofísicas dos compostos fluorescentes, aumentando, diminuindo e/ou desviando a emissão da fluorescência^{8,9}, e é uma abordagem interessante para o desenvolvimento de novos materiais. Assim, o entendimento pormenorizado dos fenômenos resultantes dessa interação pode ser muito útil para o desenvolvimento de pesquisas nas áreas de microscopia, elucidação de processos e atividades celulares, sensores e testes diagnósticos.

Inúmeras substâncias podem emitir fluorescência e atualmente um grupo vem ganhando destaque nas pesquisas, os derivados do anel borodipirrometeno, conhecidos pelo acrônimo BODIPY. Eles se destacam pelo brilho intenso, alto rendimento quântico e estabilidade química. No que se refere a nanotecnologia, com destaque às AuNPs, diversos materiais com diferentes aplicações vêm sendo desenvolvidos, caracterizando um campo de pesquisa emergente e com grandes perspectivas para os próximos anos.

Sabendo da importância tecnológica de sistemas de AuNPs em diversas aplicações é interessante elucidar as propriedades de sistemas de AuNPs conjugadas a fluoróforos orgânicos. Além disso, determinar os modos de conjugação entre AuNPs e fluoróforo pode dar suporte ao desenvolvimento de novos materiais. Assim, neste trabalho desenvolvemos um método de funcionalização de AuNPs com BODIPYs, com intuito de aplicar o material em nano e biossensores, nanotoxicologia e em técnicas de imunocromatografia fluorescente baseados nas junções das propriedades óticas e eletrônicas das AuNPs e dos compostos fluorescentes.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOTECNOLOGIA

De acordo com o National Nanotechnology Initiative¹⁰, as nanopartículas (NPs) são definidas como materiais que possuem escala microscópicas com variação de 1 a 100nm (10^{-9} metro). Justamente por conta do seu tamanho diminuto, bem como das formas variadas que essas partículas podem assumir, as NPs possuem características singulares relacionadas às suas propriedades ópticas, eletrônicas¹¹ e catalíticas¹², além da excelente relação área/volume, favorecendo uma melhor interação e reatividade.

A nanotecnologia é um campo emergente que criou grandes oportunidades, seja por meio do desenvolvimento de novos materiais ou pelo aprimoramento das propriedades dos já existentes. Vale ressaltar que esta é uma área de pesquisa inter e multidisciplinar, com impacto científico nas áreas da química, física, engenharia, medicina, biologia e informática, permitindo atuação em inúmeras aplicações.

As NPs podem ser produzidas de diversos materiais como metais, polímeros, lipídios, materiais magnéticos e pontos quânticos, e são sintetizadas por processos físicos, químicos ou até mesmo biológicos. Com alterações nos métodos e materiais de partida, é possível sintetizar partículas de formatos variados como esferas, cubos, tubos, prismas, octaedros e outros¹³ e cada forma irá apresentar diferentes propriedades físicas¹⁴.

A síntese de nanopartículas pode seguir dois princípios distintos: síntese "*top down*", ou seja, de cima para baixo; ou síntese "*bottom up*", de baixo para cima. Para procedimentos "de cima para baixo", um estado macro é sistematicamente dividido para gerar um material progressivamente menor a fim de sintetizar nanopartículas de dimensões desejadas. Neste caso, a montagem e formação de partículas são controladas por um padrão ou matriz. No entanto, o método "de cima para baixo" é limitado em relação ao controle do tamanho e forma das partículas. Em contraste, na estratégia "*bottom up*", a formação de NPs se origina de partículas individuais, como átomos ou moléculas, através da indução de um auto-arranjo entre elas ou da redução dos íons que irão compor o material de moléculas individuais, e envolve uma redução química ou biológica¹⁵.

2.1.1 Nanopartículas de Ouro

O ouro é um material inerte e resistente à oxidação, o que o torna uma importante ferramenta para uso em tecnologias em nanoescala. Ressalta-se ainda dentre as vantagens do ouro da produção de materiais nanoparticulados, a facilidade na funcionalização da superfície, a alta estabilidade química e biocompatibilidade¹⁶.

O uso do ouro coloidal é datado desde a Roma antiga, para uso medicinal. Durante a idade média, as nanopartículas de ouro foram utilizadas também para fins decorativos além do uso terapêutico. Em 1857, o cientista inglês Michael Faraday foi o primeiro a correlacionar a coloração avermelhada a nanopartículas de ouro e notar que a variação de cor da solução coloidal estava relacionada ao tamanho das partículas¹⁷. Gustave Mie, em 1908, no que ficou conhecido como a Teoria de Mie, conseguiu explicar a razão das cores do ouro coloidal, através da solução das equações de Maxwell sobre eletromagnetismo¹⁸. A partir da década de 1950, a nanotecnologia ganhou maior espaço na ciência, e em 1951 Jonh Turkevich propôs um método de síntese química das AuNPs, através da redução dos íons de ouro com o uso de citrato de sódio como agente redutor¹⁹. O método ainda é amplamente utilizado atualmente, sendo adaptado e empregado por diversos grupos de pesquisa, inclusive neste estudo.

Devido às suas propriedades, as AuNPs atraem muita atenção em diversas áreas de pesquisa, propriedades que dependem da forma, carga, estrutura cristalina, revestimento superficial e da tendência para formar agregados. Com a diminuição do diâmetro das NPs, há um incremento da sua área superficial, logo, ocorre também um aumento da reatividade/conjugação com outros átomos e/ou moléculas²⁰, permitindo a funcionalização com agentes específicos para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades interessantes. Dependendo do objetivo a ser desenvolvido, as AuNPs podem ser conjugadas a sondas fluorescentes²¹, DNA²², anticorpos²³ e fármacos²⁴ (Figura 1), através de interações eletrostáticas ou de ligação covalente. No caso de AuNPs sintetizadas através da redução por citrato, devido à fraqueza das ligações Au-citrato, a substituição dos ligantes de citrato por ligantes tiolato ocorre facilmente. Esta substituição é experimentalmente muito simples e envolve a reação das citrato-AuNPs com tióis¹⁵. A presença de enxofre, em

grupos funcionais como tiol, tiocianato e isotiocianato, permite uma melhor estabilidade das AuNPs e podem proporcionar novas propriedades ou funções para as partículas, uma vez que o uso de ligantes/espaçadores são comumente utilizados em ensaios de conjugação covalente com biomoléculas²⁵.

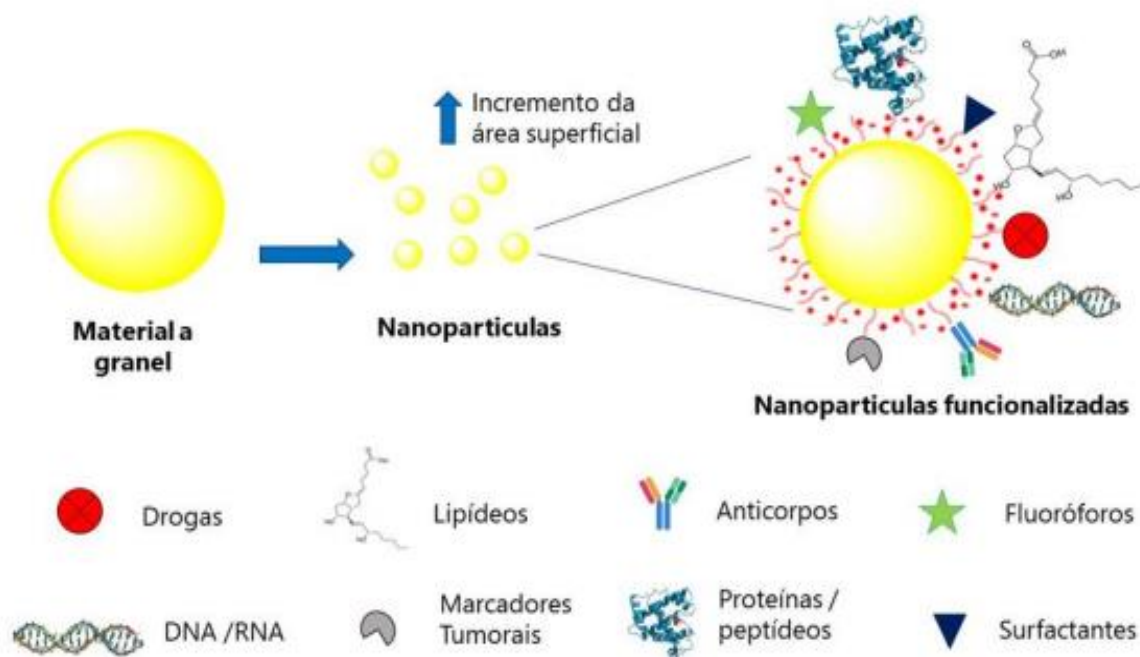


Figura 1. Diagrama de funcionalização superficial de nanopartículas ²⁰.

As propriedades físicas das AuNPs fazem com que elas interajam de maneiras diversas com a luz (Figura 2), conferindo a elas propriedades ópticas específicas. Vale ressaltar o espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS), a fluorescência melhorada pelo metal (MEF) e a ressonância plasmônica de superfície (RPS) como exemplo de fenômenos ópticos de interesse para o nosso trabalho.

A espectroscopia de Raman é uma técnica baseada no espalhamento inelástico da energia do laser incidente, resultando em picos espectrais, devido aos modos vibracionais da molécula, que são deslocados em frequência a partir da energia incidente²⁶. A SERS, é uma técnica derivada do Raman, e fornece informações sobre o material que foi adsorvido na superfície das NPs e possui uma sensibilidade mais alta que a espectroscopia de Raman normal. A SERS surge de um mecanismo com as seguintes etapas: (1) Um analito é adsorvido em uma NP, então a frequência de

excitação é escolhida e irá excitar o plasmon e criar o espalhamento. (2) A energia do plasmon é transferida para as moléculas adsorvidas e o processo Raman ocorre na molécula adsorvida. (3) A energia é transferida de volta para o plasmon, menos a quantidade transferida para o material adsorvido, e espalhados da superfície conforme o comprimento de onda de excitação²⁷.

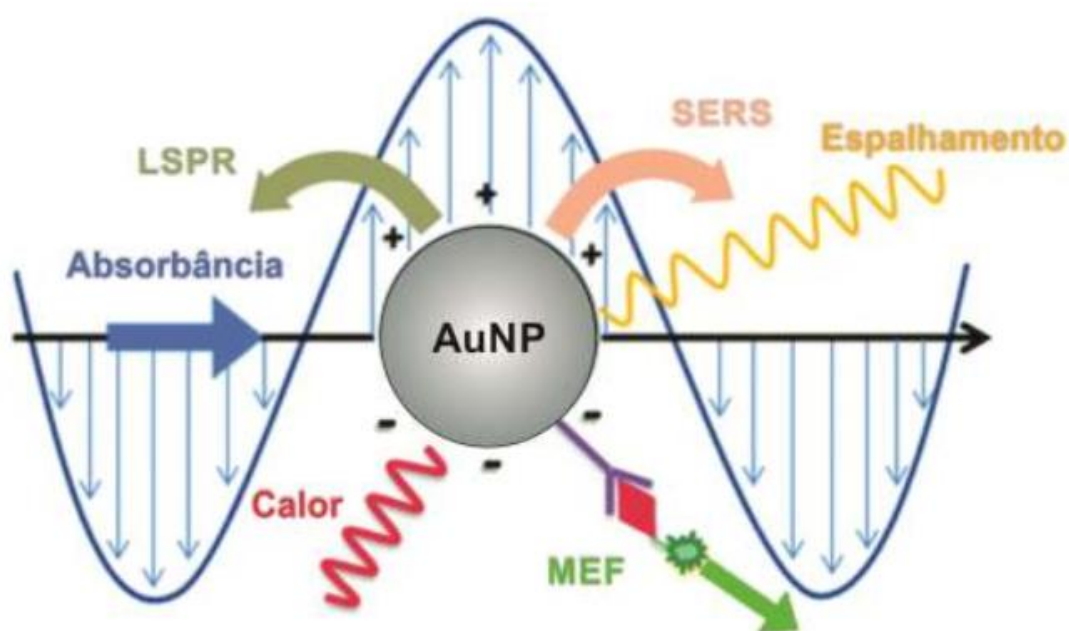


Figura 2. Representação esquemática das oscilações de carga de superfície induzida causadas por um campo de luz externa e possíveis respostas espectroscópicas²³.

Já ressonância plasmônica de superfície (RPS) é, talvez, o fenômeno de maior importância das AuNPs, sendo caracterizado pela oscilação coletiva dos elétrons livres da banda de condução, criando uma densidade de carga na sua superfície quando submetidas a um campo eletromagnético¹¹ (figura 3). O fenômeno está intimamente relacionado ao tamanho das NPs e a adsorção de moléculas sobre a superfície das partículas, resulta em mudanças no índice de refração próximo à superfície do metal e, como consequência, a RPS ocorrerá em uma frequência diferente, sendo possível seu uso como uma importante ferramenta analítica²⁸.

O MEF se trata de um fenômeno relacionado com o conceito de fluorescência e será abordado posteriormente em um subtópico específico.

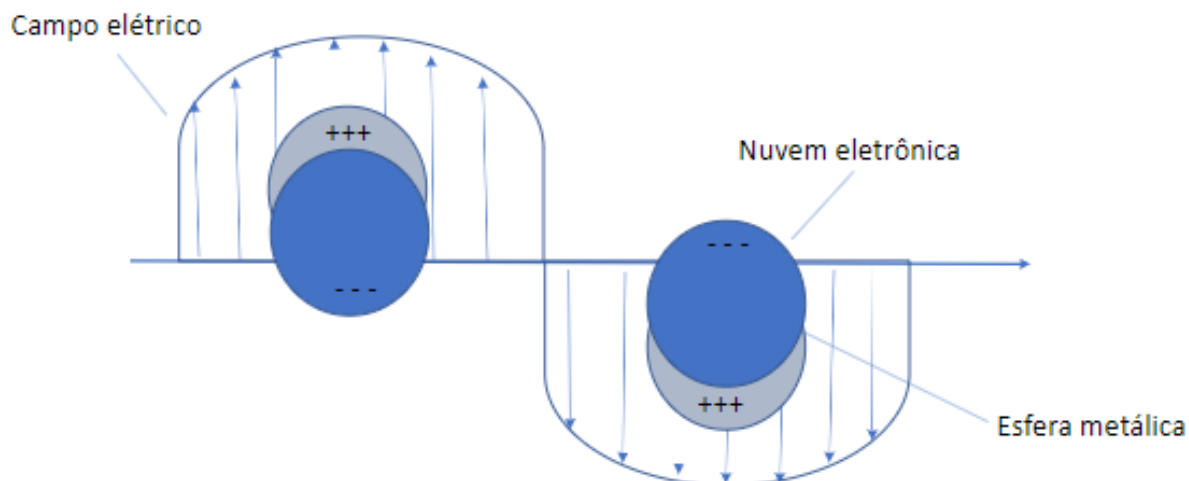


Figura 3. Representação da ressonância plasmônica de superfície.

2.2 FLUORESCÊNCIA

Relatada pela primeira vez pelo botânico Nicolas Monardes, em 1565, ao observar a emissão de luz pelo extrato vegetal de *Lignum Nephriticum*, a fluorescência pode ser descrita, de maneira resumida, como um fenômeno físico de emissão de luz. Ao longo dos séculos, inúmeros cientistas pesquisaram e publicaram sobre esse fenômeno²⁹. Em 1602, Cascariolo foi o primeiro a reportar e explorar o fenômeno da fosforescência, observada em rochas de barita, no que ficou conhecido como a pedra de Bolonha. Já em 1845 John Herschel, relatou o aparecimento de um “belo azul celestial” na superfície de uma solução de sulfato de quinina, fenômeno denominado por ele como dispersão interna da luz. Logo após, em 1852, George Gabriel Stokes, dando continuidade aos estudos de Herschel com soluções de sulfato de quinina, publicou um artigo intitulado “*On the refrangibility of light*”, no qual propôs que o fenômeno se tratava da emissão de luz após a absorção de luz, sendo o responsável de introdução do termo fluorescência²⁹⁻³².

A fluorescência é um fenômeno físico que está contido em um contexto mais amplo, o da luminescência. Definida como a emissão de luz por corpos frios após o decaimento de energia em materiais em um estado eletrônico excitado, a luminescência é classificada de acordo com o estímulo que gerou o estado excitado, podendo ser um estímulo elétrico, através do atrito, calor, reação química, estímulo

luminoso, dentre outros. Quando a emissão resulta de um estímulo luminoso, observamos a fotoluminescência, que por sua vez é dividida em duas categorias – fluorescência e fosforescência. Esses dois tipos de fotoluminescência diferem um do outro de acordo com a multiplicidade do estado excitado da substância. Enquanto a fluorescência resulta de um estado excitado singleto, a fosforescência resulta de um estado excitado tripleto. O estado tripleto é alcançado em uma escala de tempo mais longa do que o estado singleto, o que explica a outra diferença essencial entre esses dois conceitos: o tempo de vida de fluorescência é mais curto do que o tempo de vida de fosforescência^{8,29}.

Muitas técnicas laboratoriais modernas dependem da análise da fluorescência, e a espectroscopia de fluorescência é atualmente uma das principais ferramentas analíticas em pesquisas na área de bioquímica, biofísica e biotecnologia⁸.

O fenômeno da fluorescência ocorre seguindo os seguintes processos: excitação, emissão e transições não radiativas (Figura 4). Na excitação, ocorre a absorção de um fóton pela espécie fluorescente, passando de um estado singleto não excitado (estado S₀) para um estado singleto excitado (níveis S₁, S₂), num processo que ocorre na ordem de 10⁻¹⁵ segundos. Já a emissão, ocorre a partir do retorno radiativo ao estado fundamental após atingir alto nível vibracional pelo processo de absorção. Após atingir o estado excitado, a espécie fluorescente retorna ao estado fundamental, liberando o excesso de energia ao ambiente circundante. Ocorre que, após a excitação, o fluoróforo também pode retornar ao seu estado fundamental com dispersão da energia por processos de vibração e liberação de calor, ou seja, sem emissão radiativa. O retorno do estado excitado ao estado fundamental sem emissão de fótons é conhecido como transição não-radiativa e compete com os processos radiativos (que geram emissão). De maneira geral, os processos não-radiativos devem ser suprimidos para alcançar alta eficiência quântica nos materiais luminescentes^{8,30}.



Figura 4. Processos do fenômeno de luminescência.

Os processos ocorridos entre a absorção e a emissão de luz são geralmente ilustrados através do diagrama de Jablonski, que é frequentemente usado como ponto de partida para discutir a absorção e a emissão de luz (Figura 5). Nesse diagrama a energia é colocada na ordenada, e os diferentes níveis energéticos e vibracionais de um material estão representados. As transições eletrônicas radiativas e não-radiativas são representadas por setas verticais conectando os níveis energéticos e a energia dessas transições eletrônicas estão relacionadas com os espectros de absorção e emissão observados experimentalmente.

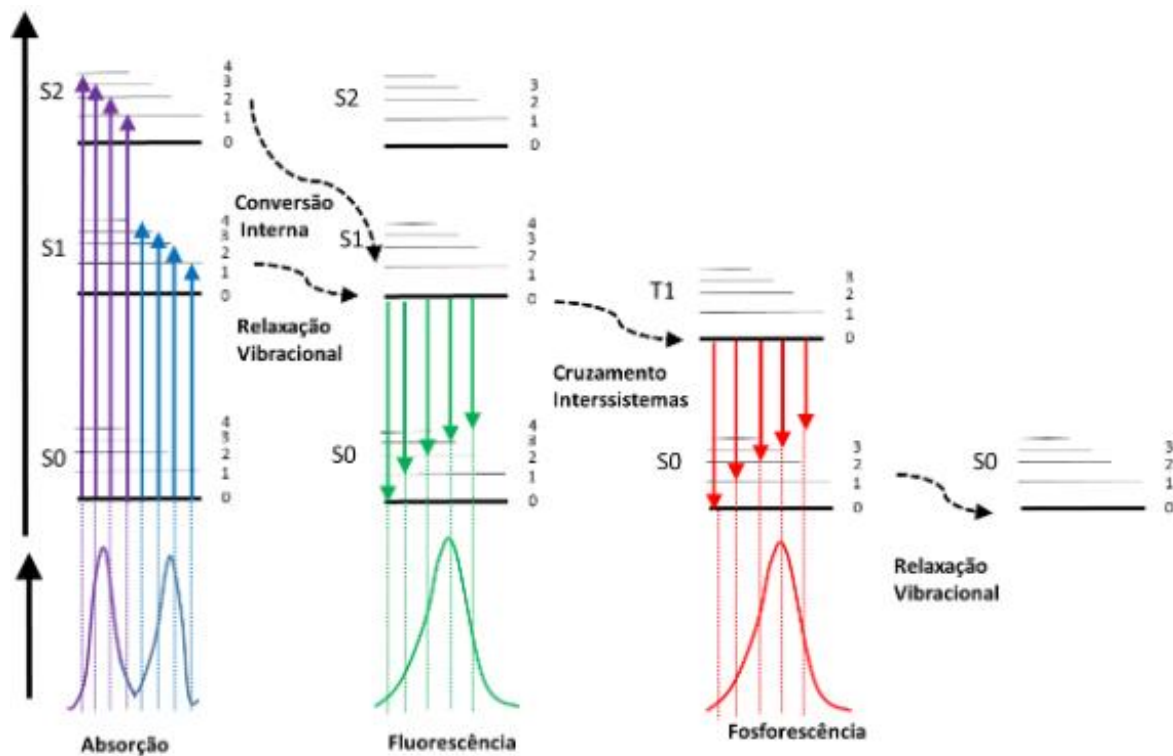


Figura 5. Diagrama de Jablonski ³¹.

O fenômeno da fluorescência exibe uma série de características gerais, entre elas o desvio de Stokes, que consiste na diferença entre o comprimento de onda de absorção (λ_{abs}) e o comprimento de emissão (λ_{em}). Devido à perda de energia nos processos não radiativos de relaxação vibracional e conversão interna, o comprimento de onda de emissão sempre será maior que o comprimento de onda de absorção, logo, menos energético^{8,30}.

Outra característica importante dos compostos fluorescentes é conhecida como rendimento quântico de fluorescência (Φ_{fl}), que consiste na razão entre o número de fótons emitidos nos processos de emissão em relação ao número de fótons absorvidos no processo de excitação eletrônica. O rendimento quântico de fluorescência é dado por um valor entre 0 e 1, sendo que um valor igual a 1 indica uma substância na qual 100% dos fótons absorvidos são emitidos na forma de fluorescência, ou seja, se trataria de uma fluorescência muito eficiente. Raros são os casos de materiais com rendimento quântico próximo à unidade, isso ocorre pois as transições não radiativas competem com as transições radiativas, assim nem todo fóton absorvido resulta em emissão de fluorescência⁸. Cabe salientar, todavia, que a intensidade de emissão de fluorescência é também determinada pelo coeficiente de absorptividade molar da substância, ou seja, a sua capacidade de absorver fótons. De maneira geral, as substâncias com intensa emissão de fluorescência são aquelas que combinam alto coeficiente de absorptividade molar e alto rendimento quântico de fluorescência.

Por fim, vale ressaltar que o tempo de vida da fluorescência (τ) também é uma característica importante a ser avaliada nos compostos fluorescentes. Essa propriedade é definida como o tempo médio que a molécula passa no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Geralmente, tempos de vida de fluorescência são próximos a 10^{-9} s, enquanto o tempo de vida de fosforescência é mais longo, na ordem de milissegundos, pois depende do processo de cruzamento intersistemas⁸. O tempo de vida de fotoluminescência dos materiais é explorado em técnicas de análises fluorimétricas resolvidas no tempo, que encontram utilização na área de microscopia resolvida no tempo (FLIM, do inglês *fluorescence lifetime imaging*), mas cuja discussão detalhada vai além do escopo deste trabalho.

2.2.1 Fluoróforos orgânicos

As substâncias fluorescentes são comumente denominadas “fluoróforos”, e diferentes técnicas fluorimétricas podem ser aplicadas na análise da emissão de fluoróforos intrínsecos ou extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente na amostra a ser analisada, como por exemplo os aminoácidos aromáticos e as coenzimas NADH e FADH (Figura 6). A análise fluorimétrica de substâncias naturalmente fluorescentes é muito conveniente, porém, na prática, poucos analitos possuem fluorescência intrínseca. Nesses casos se faz necessária a aplicação de fluoróforos extrínsecos, adicionados às amostras para atuarem como sondas fluorescentes⁸.

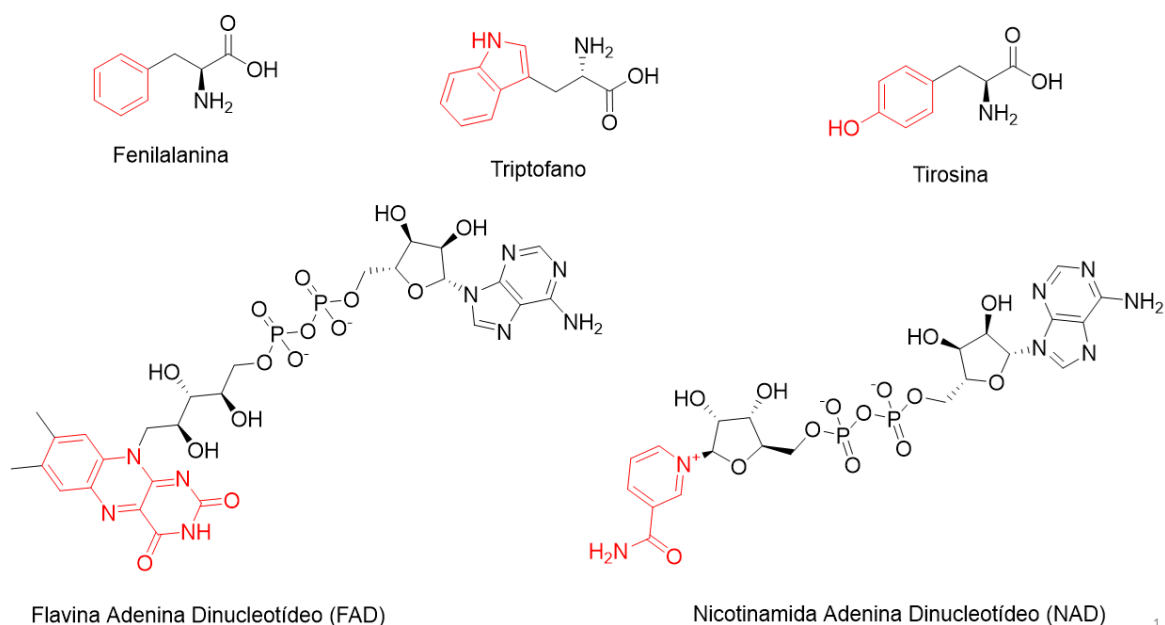


Figura 6. Exemplo de fluoróforos intrínsecos. Em vermelho, a parte responsável pela fluorescência do composto.

A fluorescência ocorre em diferentes materiais, como compostos orgânicos aromáticos e heteroaromáticos, cátions de lantanídeos (Eu e Tb), pontos quânticos e até mesmo em algumas proteínas^{8,29}. As pequenas moléculas orgânicas (Figura 7) como os derivados de fluoresceína, rodamina, cianinas e cumarinas estão entre os fluoróforos de uso mais difundido na área da bioquímica e biotecnologia⁸. Nota-se que a presença de anel aromático ou heteroaromático é comum nos compostos

fluorescentes, uma vez que a presença de ligações π conjugadas em um sistema rígido diminui a perda de energia por vias não-radiativas, favorecendo a emissão da fluorescência³⁰.

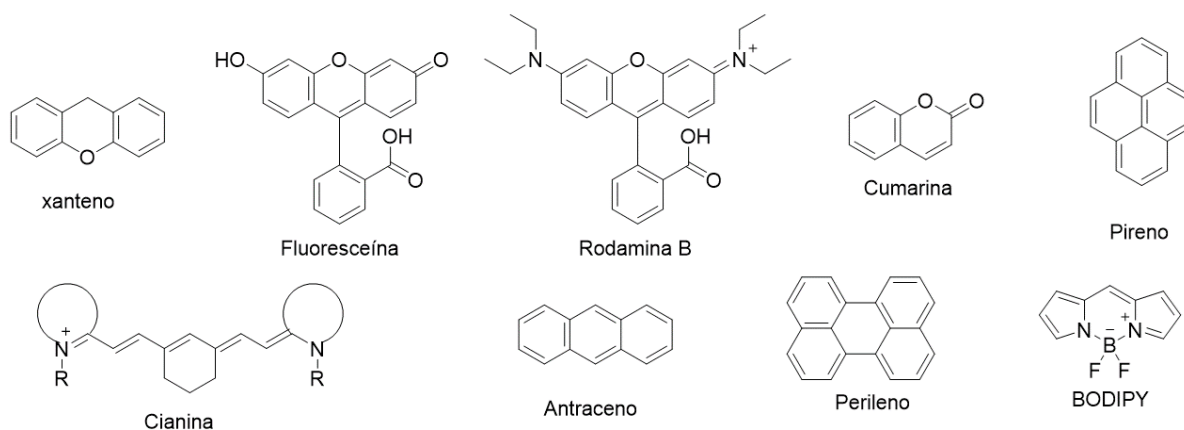


Figura 7. Exemplos de fluoróforos derivados de pequenas moléculas orgânicas.

2.2.2 Derivados borodipirrometeno (BODIPY)

Dentro da classe dos compostos orgânicos fluorescentes, se encontram também os boro-dipirrometenos (BODIPYs), corantes cuja aplicação foi introduzida no final da década de 1980 e que vêm substituindo derivados da fluoresceína e rodamina em várias aplicações tecnológicas. Quimicamente, os BODIPYs são complexos de dipirrometeno com um átomo de boro quaternário (Figura 8) que geralmente possuem propriedades fotofísicas interessantes como brilho intenso, alto rendimento quântico de fluorescência, e alto coeficiente de absorptividade molar. Além disso, se trata de uma classe de substâncias altamente versátil e estáveis, cujas propriedades e aplicações podem ser alteradas a partir de métodos de funcionalização⁸.

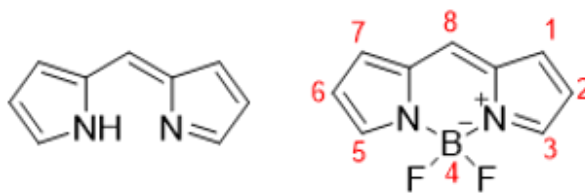


Figura 8. Estrutura química do anel BODIPY.

Assim como as AuNPs, os BODIPYs podem ser submetido a reações de funcionalização, visando o desenvolvimento de substâncias com propriedades específicas (detecção, quantificação, microscopia, fototerapia), e diversos grupos de pesquisa vêm desenvolvendo métodos de funcionalização dos BODIPYs afim de produzir fluoróforos com características e propriedades específicas. A funcionalização dos BODIPYs pode ser alcançada a partir de alterações nos materiais de partida utilizados na sua síntese, a pré-funcionalização, ou através da reação direta de um BODIPY para inserção de um grupo químico, a pós-funcionalização (Figura 9A).

A funcionalização de BODIPYs é útil no desenvolvimento de fluoróforos com características ópticas diversas. Fluoróforos com emissões deslocadas para o vermelho, podem ser obtidos a partir de reações de substituição nas posições 3 e 5, enquanto a preparação de BODIPYs deslocados para o azul envolve a inserção de aminas na posição 8^{33,34}. Outro exemplo da aplicação de modificação estrutural dos BODIPYs, é a funcionalização com grupos funcionais reativos, visando a aplicação de corantes fluorescentes em bioquímica para bioconjugação com biomoléculas, como anticorpos e proteínas em geral. Nesse contexto, corantes fluorescentes são comumente funcionalizados com grupos funcionais que reagem diretamente ou indiretamente com grupos funcionais presentes nas biomoléculas. Um exemplo é a aplicação do grupo isotiocianato, que se trata de um grupo funcional amino-reativo relativamente estável que é amplamente utilizado em bioconjugações. O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é o exemplo clássico de um fluoróforo funcionalizado com o grupo funcional isotiocianato, e se trata de um fluoróforo comercial e amplamente utilizado como sondas para marcação em biomoléculas (Figura 9B). Alguns derivados do BODIPY funcionalizados com o isotiocianato também já foram sintetizados, a fim de encontrar aplicações em bioconjugação^{35,36}. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa uniu os conceitos de funcionalização para diversificação fotofísica e funcionalização com isotiocianato para o desenvolvimento de BODIPYs amino-reativo com emissão desviada para o vermelho³⁷, um dos quais foi utilizado neste trabalho (Figura 9C).

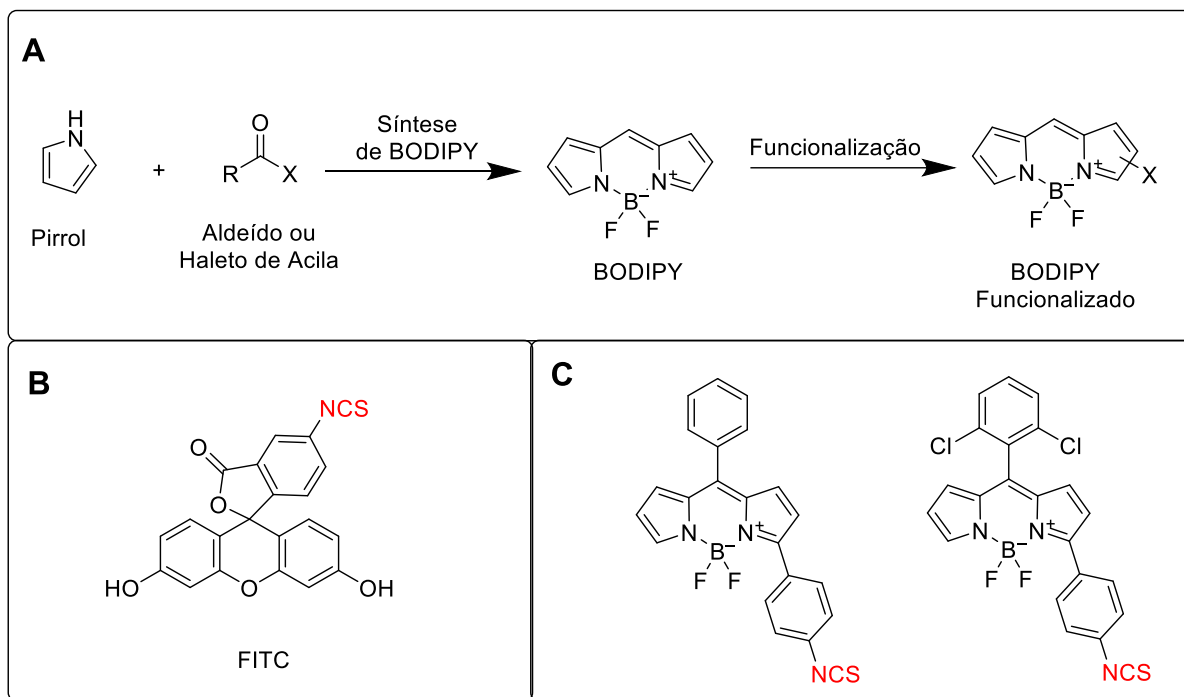


Figura 9. A: Processo de síntese, pré e pós funcionalização dos BODIPYs. B: Estrutura do FITC C: Estrutura de BODIPY-isotiocianato desenvolvidos pelo grupo.

2.3 CONJUGAÇÃO AuNPs-FLUORÓFOROS

A interação entre fluoróforos e AuNPs pode influenciar as propriedades dos compostos fluorescentes, a depender das características específicas de cada composto e da sua interação com a AuNP. A intensidade da emissão de fluorescência, por exemplo, pode variar com o diâmetro da nanopartícula metálica e com a distância entre a nanopartícula e o fluoróforo conjugado^{8,9}. Os primeiros estudos sobre a interação entre metais e compostos fluorescentes datam da década de 1970, quando Drexhage publicou o artigo *Influence of a dielectric interface on fluorescence decay time*. No trabalho, o autor concluiu que quando um espelho é colocado próximo a uma molécula fluorescente, não apenas a distribuição angular da fluorescência é afetada, mas também o tempo de decaimento. Isso ocorre porque parte da onda de luz emitida é refletida pelo espelho e interfere na parte não refletida³⁸.

Ao longo dos anos, diversos outros pesquisadores^{8,9,39-42} comprovaram a teoria de que metais localizados próximos a compostos fluorescentes interferem na emissão da fluorescência. Atualmente é possível afirmar que as alterações das propriedades

fotofísicas decorrem de algum dos seguintes mecanismos: 1) transferência de energia do fluoróforo para o metal - nesse caso, a proximidade de uma superfície metálica pode amortecer o dipolo oscilante, extinguindo a fluorescência; 2) concentração do campo eletromagnético - quando estruturas metálicas atuam como antenas concentrando o campo em locais onde o fluoróforo está localizado, conseqüentemente, aumentando a fluorescência; 3) modificação da taxa de decaimento radiativo do fluoróforo através da modificação local da densidade de estados dos fótons - com aumento da taxa radiativa, e diminuição a vida útil do fluoróforo^{9,39}.

2.3.1 Transferência de energia

A transferência de energia entre fluoróforo e metal acontece através do fenômeno denominando transferência de energia por ressonância de Foster (FRET) e ocorre entre duas espécies sensíveis à luz, sendo elas um doador e a outra, um acceptor. Este fenômeno é caracterizado pela transferência de energia de forma não-radiativa entre a substância doadora e a acceptora. O fluoróforo doador, é excitado pela radiação em seu comprimento de onda específico, resultando na formação do seu estado excitado. Em seguida ocorre o processo de decaimento para um estado de menor nível energético, todavia, a energia que seria emitida como fluorescência é transferida de forma não radiativa por FRET para a substância que esteja fisicamente próxima, o acceptor. Enquanto o doador retorna ao estado fundamental, o acceptor é excitado ao seu estado excitado, a partir do qual ele pode emitir fluorescência, retornado também ao seu estado fundamental (Figura 10). Este efeito é local, e sua eficiência decai com a sexta potência da distância entre os fluoróforos, ou seja, uma medida da intensidade de emissão pode indicar a distância em que os fluoróforos se encontram, sendo uma ferramenta bastante utilizada para medir a distância entre sítios de ligação e organelas celulares por exemplo⁸.

Ocorre, que ao invés do uso de um fluoróforos como acceptor, podem ser introduzidos supressores de fluorescência, e esses supressores geralmente apresentam um amplo espectro de absorção e um alto coeficiente de extinção, sendo as AuNPs boas candidatas para essa função⁴³. Muitos trabalhos⁴⁴⁻⁴⁸ já utilizam o termo *Nanosurface energy transfer* (NSET) ao se referir ao fenômeno de transferência de energia quando o acceptor é uma nanoestrutura. Embora o fenômeno FRET seja muito conveniente e

possa ser aplicada rotineiramente no limite de detecção de uma única molécula, a escala de comprimento para detecção usando o método FRET é limitada pela natureza do mecanismo dipolo-dipolo. Uma vez que o FRET se origina fisicamente do acoplamento eletromagnético fraco de dois dipolos, espera-se que a introdução de dipolos adicionais irá fornecer mais interações de acoplamento, logo, NSET poderá contornar esse limite do FRET e as distâncias mensuráveis são duas vezes a mais que as obtidas pelo FRET e seguem uma dependência de distância de $1 / d^4$ ⁴⁶.

Fluoróforos situados na vizinhança de nanopartículas metálicas, geralmente experimentam a supressão de sua fluorescência. O aumento de campo eletromagnético local leva a um aumento da taxa de excitação, enquanto a transferência de energia não radiativa para a partícula leva à diminuição do rendimento quântico (extinção). Devido a esses efeitos concorrentes, os experimentos mostram que o aumento ou extinção da fluorescência é dependente da distância entre AuNP e fluoróforo. A fluorescência pode diminuir ou aumentar dependendo de como a partícula de ouro afeta a taxa de excitação do cromóforo, $R_{(excitação)}$ e as taxas de decaimento radiativo e não radiativo de seu estado excitado, $R_{(radiativa)}$ e $R_{(não\ radiativa)}$, que juntos determinam a taxa de emissão de fluorescência observada, $R_{(emissão)}$ ⁴⁴.

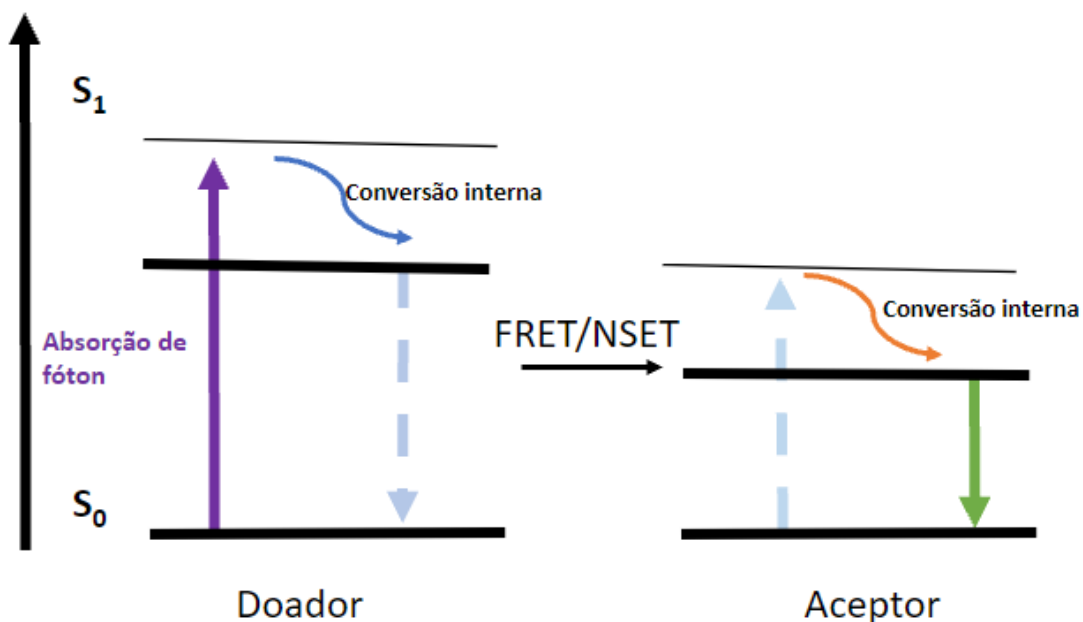


Figura 10. Mecanismo do FRET/NSET.

2.3.2 Metal enhanced fluorescence (MEF)

O MEF (*Metal enhanced fluorescence* - Fluorescência melhorada pelo metal) é um efeito físico que ocorre quando fluoróforos estão localizados a uma distância nanométrica de uma superfície metálica. Esse processo é caracterizado pelo aumento da taxa de emissão de fluorescência, do rendimento quântico e da fotoestabilidade e da diminuição do tempo de vida da fluorescência⁴⁹. O MEF também pode ser chamado de *Surface enhanced fluorescence* (SEF), *plasmon enhanced fluorescence* ou *metal induced fluorescence enhancement* (MIFE)³⁹.

O fluoróforo no estado eletrônico excitado tem as propriedades de um dipolo oscilante, podendo induzir oscilações dos elétrons no metal que se encontra próximo. Já o campo elétrico criado pelo metal, pode interagir com o fluoróforo excitado e alterar sua emissão (Figura 11). Essa interação é bidirecional, de modo que as oscilações induzidas pela luz no metal podem afetar o fluoróforo⁸.

Assim como a NSET, a ocorrência do MEF também depende do tamanho das NPs e distância entre os materiais. Para que essa interação aumente o rendimento quântico e melhore a fotoestabilidade, é necessária uma distância de 5-90nm entre os a NP e o fluoróforo⁴². Na verdade, o MEF parece ser sustentado pela formação de um dipolo espelhado na nanopartícula metálica, que por si mesma irradia de forma altamente eficiente, resultando efetivamente em um aumento da fluorescência ⁴⁹. Em nanopartículas metálicas, o espectro de extinção é resultado de um componente de absorção e um de espalhamento. Assim, para partículas menores (<25 nm), a extinção, é em sua maior parte dominada pela absorção, enquanto para partículas maiores, por espalhamento, então as partículas maiores mostraram-se melhores para o MEF. Em outras palavras, o componente de espalhamento da extinção de AuNPs contribui para o MEF e o componente de absorção contribui para a extinção. Assim, para AuNPs com diâmetro superior a 80 nm, onde o rendimento de espalhamento de luz é superior a 50%, o MEF tende a ocorrer⁴¹.

Existem dois processos principais que são considerados os responsáveis pelo MEF: 1) acoplamento não radiativo do estado excitado das espécies fluorescentes aos plasmons das superfícies metálicas, que é subsequentemente irradiado pelas próprias nanopartículas e 2) absorção aumentada de luz por fluoróforos devido ao aumento dos campos elétricos entre e ao redor das nanopartículas metálicas. Assim

é possível concluir alguns aspectos em relação ao fenômeno: i) MEF é mais pronunciado para partículas maiores; ii) a dependência ao comprimento de onda sugere uma correlação entre os espectros de espalhamento do nanopartículas e os espectros de emissão dos fluoróforos; iii) MEF é ângulo-dependente, tanto para excitação, quanto para a detecção; iv) metais ideais para MEF são aqueles com altas densidades de elétrons livres⁴⁹.

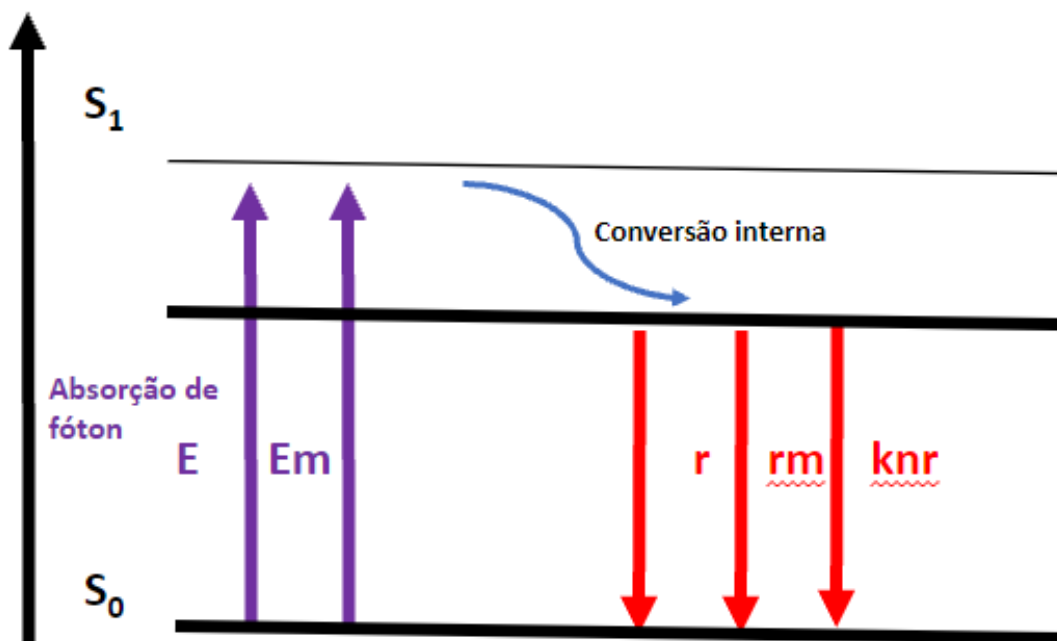


Figura 11. Mecanismo do MEF.

2.3.3 Modificação da taxa de decaimento radiativo

Neste outro fenômeno, a emissão espontânea do fluoróforo ocorre em um “espaço livre”, ou seja, em meios não condutores e opticamente transparentes. O termo *Radiative decay engineering* (RDE) é usado quando o ambiente ao redor do fluoróforo é modificado ou projetado para alterar a queda da taxa de radiação do fluoróforo. A taxa de decaimento radiativo (Γ) é determinada pelo coeficiente de extinção do fluoróforo, e não muda substancialmente em ambientes diferentes. Da mesma forma, as taxas de decaimento radiativo permanecem quase as mesmas na maioria das condições. As mudanças no rendimento quântico ou no tempo de vida de fluorescência exibido pelos fluoróforos em diferentes ambientes são devidas às mudanças nas taxas de decaimento não radiativo. Assim, RDE é um campo de estudo

em ascensão e responsável por um controle da densidade fotônica dos materiais fluorescentes ⁵⁰.

Neste contexto, nanopartículas metálicas têm sido utilizadas para promover essa alteração nas taxas de decaimento, pois há modificação do “espaço livre” para a emissão da fluorescência. Um fluoróforo é um dipolo oscilante, mas que oscila em alta frequência e irradia comprimentos de onda curtos. A superfície metálica que se encontra próxima, pode responder ao dipolo oscilante e modificar a taxa de emissão e a distribuição espacial da energia irradiada, logo, o campo elétrico sentido pelo fluoróforo é afetado pelas interações da luz incidente com a superfície metálica, e também pela interação do dipolo oscilante do fluoróforo com o dipolo da superfície metálica. Além disso, o dipolo oscilante dos fluoróforos induz um campo no metal. Essas interações podem aumentar ou diminuir o campo incidente no fluoróforo e aumentar ou diminuir a taxa de decaimento radiativo, como exemplificado nos subitens acima⁸.

3) OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Visando gerar subsídios para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades ópticas particulares, o objetivo geral deste trabalho foi estudar o efeito da conjugação de fluoróforos do tipo BODIPY com nanopartículas AuNPs por diferentes métodos. Para tal, definimos alguns objetivos específicos expostos a seguir.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estabilidade das nanopartículas em diferentes condições de reação;
- Testar a conjugação eletrostática de diferentes fluoróforos às AuNPs,
- Testar a conjugação covalente de fluoróforos-isotiocianato às AuNPs,
- Caracterizar as propriedades dos conjugados AuNP-fluoróforo;

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DAS AUNPS

A preparação das amostras foi iniciada com síntese das nanopartículas de ouro (Figura 12), de acordo com a metodologia descrita a seguir:

Primeiramente todas as vidrarias foram lavadas com água régia três vezes e posteriormente lavadas seis vezes com água destilada. Em um balão de fundo redondo, acoplado a um condensador, 90 mL de solução de Ácido cloráurico tetra hidratado – HAuCl_4 (Sigma Aldrich - 254169) a $2,5 \times 10^{-4}$ molar foi mantida sob aquecimento e agitação até entrar em ebulição. Foram adicionados 6 mL da solução de citrato de trisódico (Sigma Aldrich - 71635) 1% e mantido o aquecimento e agitação por 15 minutos. A solução foi resfriada em banho de gelo e depois submetida à centrifugação. Foram realizadas três lavagens com água ultrapura para remoção das substâncias que não reagiram. A água ultrapura para todos os ensaios e soluções foi obtida pelo sistema de purificação Synergy® Et Synergy UV.

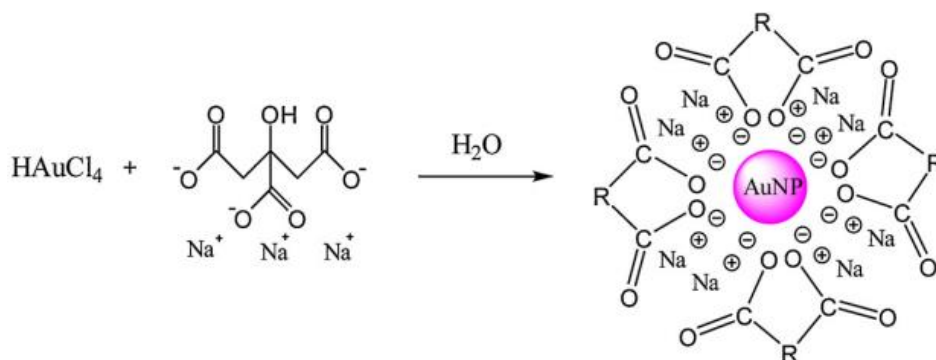


Figura 12. Reação da síntese das AuNPs⁵⁷.

4.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS AUNPS

A estabilidade, ou seja, a não agregação das AuNPs pode ser medida através da avaliação do seu espectro de absorção UV-visível, pois a ressonância plasmônica sofre alteração com a mudança de tamanho das AuNPs¹¹.

Os BODIPYs utilizados em nossa pesquisa, possuem característica apolar e, portanto, são pouco solúveis em meio aquoso. Uma vez que as nanopartículas de ouro são sintetizadas em meio aquoso, vimos a necessidade de alterar o meio de

dispersão das nanopartículas a fim de possibilitar a solubilização dos fluoróforos. Diante disso estudamos a estabilidade do material em diferentes condições aquosas contendo co-solventes orgânicos.

A transferência de fase é feita da seguinte maneira: após a terceira lavagem, as AuNPs são ressuspensas em diferentes soluções aquosas contendo co-solventes orgânicos com diferentes concentrações. Os seguintes co-solventes foram utilizados: acetona, acetonitrila, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, isopropanol e metanol, nas concentrações de 10, 15, 20, 30, 40 e 50%. A medida da estabilidade das AuNPs é feita através da análise do espectro de absorção das amostras no espectrofotômetro Ocean Optics USB 2000 e analisadas no software Spectra Suite e OriginPro 8.5.

4.3 BIBLIOTECA DE FLUORÓFOROS ORGÂNICOS

Foram selecionados seis BODIPYs (figura 13) da biblioteca de compostos fluorescentes do nosso grupo de pesquisa que foram preparados em um trabalho anterior³¹. Os compostos foram denominados de **1** a **6**, e possuem emissão máxima entre 501 e 586 nm, comprimentos de onda ideal para que ocorra a sobreposição dos espectros entre os corantes e as AuNPs, uma das condições para que ocorra modificação nos espectros de absorção e/ou emissão dos compostos e posterior análise da influência do metal sobre os corantes.

As AuNPs podem ser funcionalizadas por diferentes agentes e essa funcionalização pode ser realizada através de adsorção química, que envolve interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de Van der Waals. Existe ainda a possibilidade de conjugação pelo processo de quimissorção⁵¹, no qual interações covalentes mais fortes são formadas, sendo que a interação através do grupamento tiol é o principal exemplo para as AuNPs. Os fluoróforos **1** a **6** não possuem grupos funcionais com enxofre, que são classicamente empregados em conjugações covalentes envolvendo AuNP, de maneira que se espera apenas conjugação por adsorção química.

Interessante notar que essas substâncias possuem diferenças em sua estrutura química permitindo avaliar se a presença ou ausência de algum substituinte influencia na funcionalização, na estabilidade e emissão de fluorescência. O composto **2** é um derivado do composto **1** contendo um substituinte 4-nitrobenzeno, e a comparação desses dois compostos pode nos trazer informações sobre a influência do grupo nitro, altamente polar, nas propriedades analisadas. Além disso, espera-se que o anel

aromático conjugado cause um desvio espectral na emissão de **2** em relação a **1**. Os compostos **4** e **6** são derivados halogenados dos BODIPYs **3** e **5**, respectivamente. Os derivados clorados possuem uma maior polaridade devido à ligação polar entre carbono e cloro, o que pode ter efeitos interessantes nas interações não-covalentes entre fluoróforos e AuNP.

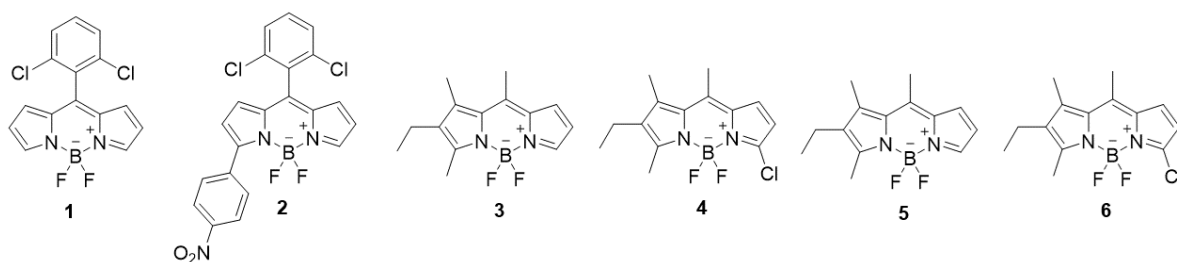


Figura 13. Fórmula estrutural dos BODIPYs **1** a **6**.

Para testarmos a conjugação covalente utilizamos o composto **7**, desenvolvido recentemente pelo nosso grupo de pesquisa³⁷, e a fluoresceína isotiocianato (FITC), fluoróforo amplamente utilizado em ensaios de bioconjugação (Figura 14). Ambos possuem o grupo funcional isotiocianato, um análogo do isocianato com um átomo de enxofre substituindo o átomo oxigênio altamente reativo frente a nucleófilos. Observa-se que os compostos **2** e **7** se diferem pela presença do grupo nitro e do grupo isotiocianato como substituinte no anel, sendo a comparação entre os dois interessante para obtermos informação sobre a influência dos diferentes grupos funcionais na interação da AuNP com os corantes e propriedades analisadas. Além disso, a presença do átomo de enxofre, ao menos em tese, poderia permitir a ligação covalente direta com as AuNPs, tanto para o composto **7** quanto para o FITC.

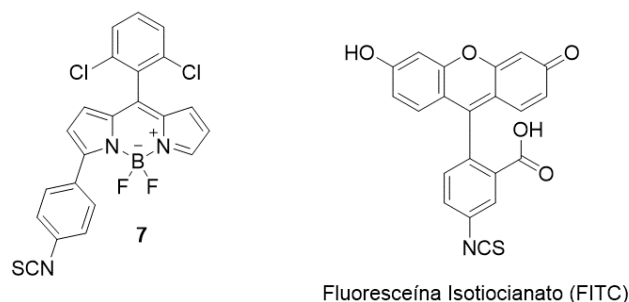


Figura 14. Fórmula estrutural do composto **7** e FITC.

Para os ensaios de caracterização, os compostos **1** a **6** foram solubilizados em uma solução de acetonitrila 50%, já o composto **7** foi solubilizado em dimetilformamida (DMF) e o FITC em uma solução de DMF 10% e posteriormente foram realizadas as medidas dos espectros de absorção e emissão das soluções. Os softwares Spekwin 1.72.2, Microsoft Excel e Origin foram utilizados para preparação dos espectros, para identificação dos valores máximas de absorção e emissão e para o cálculo do desvio de Stokes. Utilizamos a Rodamina B como padrão comparativo na conjugação eletrostática com os demais compostos.

4.4 CONJUGAÇÃO ELETROSTÁTICA DOS FLUORÓFOROS 1 A 6 COM AUNPS

Primeiramente realizamos experimento a fim de determinar o tempo ideal de conjugação entre os fluoróforos e as AuNPs, utilizando a Rodamina B como modelo. Para tal, 100 μL da solução de rodamina B (Sigma Aldrich - C.I.45170) [100 μM] é adicionada a 1 mL de AuNPs. A solução é mantida sob agitação (200 rpm). Alíquotas são retiradas a cada 10 minutos e submetidas a centrifugação a 14.000 rpm (16.813 G) por 20 minutos. A medida do espectro de absorção do sobrenadante é realizada no espectrofotômetro Ocean Optics USB 2000 e analisado no software Spectra Suit e Origin 8.5.

Já o ensaio de caracterização do conjugado foi realizado adicionando 100 μL do corante [0,0125 mg/mL] solubilizados em uma solução de acetonitrila 50%, a 1mL de AuNP. A solução foi mantida sob agitação por 30 minutos (200 rpm). Posteriormente, as amostras foram submetidas a centrifugação a 14.000 rpm (16.813 G) por 20 minutos. As medidas de fluorescência do sobrenadante e do pellet foram realizadas no espectrofotômetro Ocean Optics USB 2000 e analisadas nos softwares Spectra

Suit e Origin 8.5. Para caracterização fotofísica dos conjugados e posterior análise da fluorescência foi feita a subtração da concentração do sobrenadante pelo valor da concentração inicial, uma solução de mesma concentração do conjugado é confeccionada, e a fluorescência é medida no espectrofluorímetro Ocean Optics USB 2000 e analisado no software Spectra Suit e Origin 8.5.

4.5 CONJUGAÇÃO COVALENTE DO FLUORÓFORO 7 E FITC COM AuNPs

O ensaio de conjugação covalente foi realizado adicionando 100 µL dos dois corantes [0,0125 mg/mL] solubilizados em dimetilformamida (DMF), a 1mL de AuNP. A solução foi mantida sob agitação por 24 horas (200 rpm). Posteriormente, as amostras foram submetidas a centrifugação a 14.000 rpm (16.813 G) por 20 minutos. As medidas de fluorescência do sobrenadante e do pellet foram realizadas no espectrofotômetro Ocean Optics USB 2000 e analisadas nos softwares Spectra Suit e Origin 8.5. Para caracterização fotofísica dos conjugados e posterior análise da fluorescência foi feita a subtração da concentração do sobrenadante pelo valor da concentração inicial, uma solução de mesma concentração do conjugado é confeccionada, e a fluorescência é medida no espectrofluorímetro Ocean Optics USB 2000 e analisado no software Spectra Suit e Origin 8.5.

4.6 CONJUGAÇÃO COVALENTE UTILIZANDO CISTEAMINA COMO ESPAÇADOR

A substituição do citrato na superfície das AuNPs por ligantes através de uma ligação covalente, melhora a estabilidade das partículas. Neste caso foi realizada a conjugação das AuNPs com cisteamina, uma substância química bifuncionalizada que atua como um *linker*. A presença de um grupo tiol em uma das extremidades da cisteamina permite ligação covalente às AuNPs, enquanto o um grupo amina na outra extremidade é responsável pela ligação do grupo isotiocianato dos compostos **7** e FITC (Figura 15).

Seguindo o processo de síntese das AuNPs, após a terceira lavagem das elas foram ressuspendidas com água ultrapura com o pH ajustado para 8. Uma solução de cisteamina foi preparada na concentração de 0,00058 mg/ml, e 500 µL dessa solução foi adicionada a 500 µL de AuNPs. A solução foi mantida em agitação por 24 horas a 200 rpm.

A conjugação com os fluoróforos, foi realizada adicionando os corantes, na razão molar 1:1 em relação a concentração da cisteamina conjugada, em 1 mL de CIS-AuNP. A solução foi mantida sob agitação por uma hora (200 rpm). Posteriormente, as amostras foram submetidas a centrifugação a 14.000 rpm (16.813 G) por 10 minutos. As medidas de fluorescência do sobrenadante e do pellet foram realizadas no espectrofotômetro Ocean Optics USB 2000 e analisadas nos softwares Spectra Suit e Origin 8.5. Para caracterização fotofísica dos conjugados e posterior análise da fluorescência foi feita a subtração da concentração do sobrenadante pelo valor da concentração inicial, uma solução de mesma concentração do conjugado é confeccionada, e a fluorescência é medida no espectrofluorímetro Ocean Optics USB 2000 e analisado no software Spectra Suit e Origin 8.5.

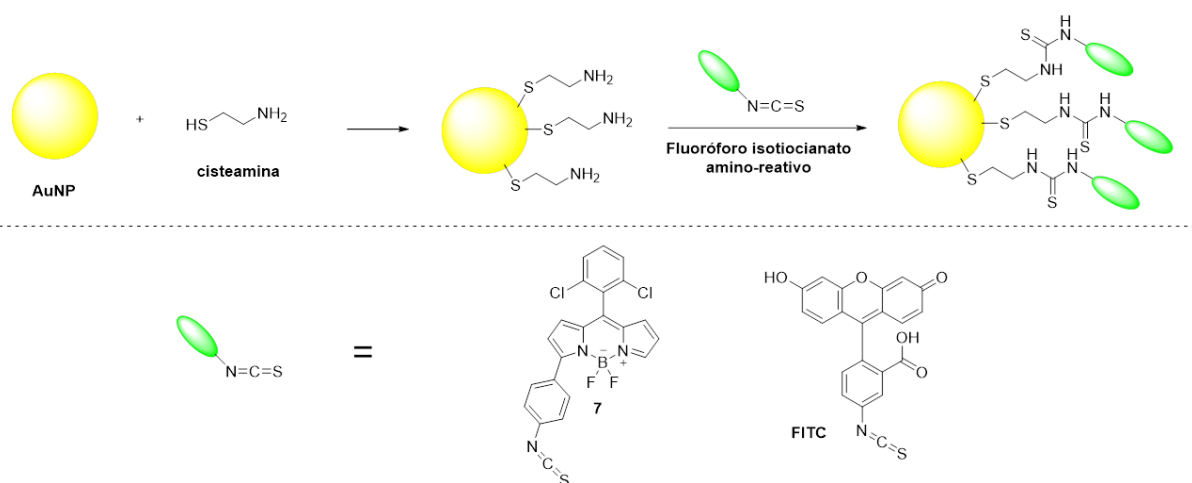


Figura 15. Esquema da conjugação covalente com utilização de espaçador.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS PREPARADOS

Para caracterização estrutural das AuNPs são realizadas as análises no espectrofotômetro UV-Visível, raio X, espalhamento dinâmico da luz (DLS) e microscópio eletrônico de transmissão (MET). A medida do potencial zeta foi utilizada para análise de estabilidade e agregação das AuNPs. Já para caracterização da superfície química e confirmação da conjugação são feitas análises da

espectrofotometria Raman. Para análise da fluorescência dos compostos livres e conjugados, as medidas foram realizadas no espectrofluorímetro.

4.7.1 Espectroscopia de UV-visível

A espectroscopia de UV-visível foi utilizada para caracterizar os compostos livres e conjugados através da medida do comprimento de onda máximo de absorção. As medidas são realizadas no espectrofotômetro Ocean Optics USB 2000 e análise dos espectros são realizadas no software Spectra Suit e OriginPro 8.5, do Laboratório de Nanomateriais Funcionais. As amostras foram preparadas conforme protocolo de síntese e conjugação já citados. Foi utilizada cubeta de quartzo e a leitura foi feita de 200 a 950 nm com intervalo de 1nm. Como branco foi utilizado água ultrapura e solução de acetonitrila 50%.

4.7.2 Raio X

A difração de raio X (DRX) foi utilizada para determinação da morfologia das AuNPs. Após a síntese, as amostras foram concentradas e secas em estufa em um vidro de relógio. A amostra foi colocada em uma lâmina de vidro e a varredura foi realizada na região 2θ , de 30° a 90° , sendo 0.01° por minuto, com uma constante de tempo de 2 segundos utilizando o difratômetro da Phillips PW 1710 (Cu ka radiação). As medidas foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do LabPetro da UFES e análise dos espectros são realizadas no software OriginPro 8.

4.7.3 DLS (Dynamic Light Scatering)

A fim de determinar o tamanho das AuNPs foi realizado o ensaio de DLS da amostra. Após a síntese das AuNPs, as amostras foram analisadas no equipamento Litesizer 500, emprestado ao Laboratório de Nanomateriais Funcionais pela Anton Parr Brasil.

4.7.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para determinação do tamanho e formato das AuNPs foram utilizadas imagens obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão. A preparação das grades foi feita da seguinte maneira: cerca de $5\mu\text{L}$ da amostra de AuNP foi gotejada sobre a grade de cobre de 400 mesh contendo um filme de polímero Formvar. As grades foram deixadas secar a temperatura ambiente. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1400, JEOL, USA inc. operado a 120kv

do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins e a confirmação do tamanho das AuNPs foi feita no Software Image J.

4.7.5 Potencial zeta

O potencial zeta é um indicador útil da carga superficial e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade das AuNPs. As amostras foram preparadas conforme protocolo de síntese já citado e a medida do potencial zeta foi realizada no equipamento Litesizer 500, emprestado ao Laboratório de Nanomateriais Funcionais pela Anton Parr Brasil.

4.7.6 Espectroscopia de Raman

A espectroscopia Raman foi realizada a fim de confirmar a conjugação das AuNPs com os fluoróforos. As amostras foram preparadas conforme protocolo de síntese e conjugação já citados e adicionadas a uma placa de 96 poços. A leitura foi realizada no espectrofotômetro Mira, Metrohm do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES).

4.7.7 Espectroscopia de fluorescência

A fim de caracterizar e confirmar interação entre as AuNPs e os fluoróforos, foi realizado a medida da emissão da fluorescência dos compostos. Foi utilizado espectrofotômetro Ocean Optics USB 2000 adaptado, para que medisse a fluorescência dos compostos (figuras 13 e 14) e a análise dos espectros foram realizadas no software Spectra Suit e OriginPro 8.5, do Laboratório de Nanomateriais Funcionais. As amostras foram preparadas conforme protocolo de síntese e conjugação já citados. A leitura foi feita em cubeta de quartzo entre 200 a 950 nm com intervalo de 1nm.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL AUNPS

O tamanho e a monodispersidade da solução coloidal podem ser obtidos através da análise do espectro da ressonância plasmonica. Utilizando a razão entre a absorção em 450 nm (A_{450}) e o pico absorção da banda plasmônica (A_{RPS})⁵². O valor obtido para o pico absorção da banda plasmônica em nosso trabalho foi de 524 nm. Dessa forma, o diâmetro médio (d) das partículas na dispersão sintetizada pode ser calculado, através da equação abaixo:

$$d = \frac{A_{RPS}}{A_{450}} \quad \text{Equação (1)}$$

Foi obtido um valor de 1,7, onde após conferência dos dados tabulares fornecido pelo estudo de Haiss⁵², confirmou o diâmetro aproximando de 20 nm, corroborando com o resultado esperado para o protocolo de síntese aplicado. (Figura 16A). A obtenção de uma banda estreita demonstra uma suspensão coloidal com característica monodispersa. As imagens obtidas no MET também confirmam o tamanho médio das nanopartículas de aproximadamente 20 nm e de formato esférico (Figura 16B). As AuNPs apresentaram diâmetro médio de 46nm (DLS). A variação de tamanho obtido entre as técnicas, se deve ao fato de o DLS medir moléculas que estão adsorvidas na superfície metálica, neste caso, o citrato de sódio.

A difração de raios X (DRX) é uma técnica utilizada para caracterizar materiais cristalinos. Fornece informações sobre a morfologia do material através da orientação preferencial do cristal. As intensidades de pico são determinadas pela distribuição dos átomos na rede, conseqüentemente, o padrão de difração de raios X é a impressão digital de arranjos atômicos periódicos em um determinado material⁵³. O padrão de difração de raio x obtido, confirma a natureza cristalina das nanopartículas (Figura 16C). Foram encontrados picos intensos de difração em 38,30 °, 44,55°, 64,71° e 77,65°, referentes aos picos de refração 111, 200, 220 e 311 respectivamente. O forte pico no plano 111 sugere predominância desse padrão de refração e orientação.

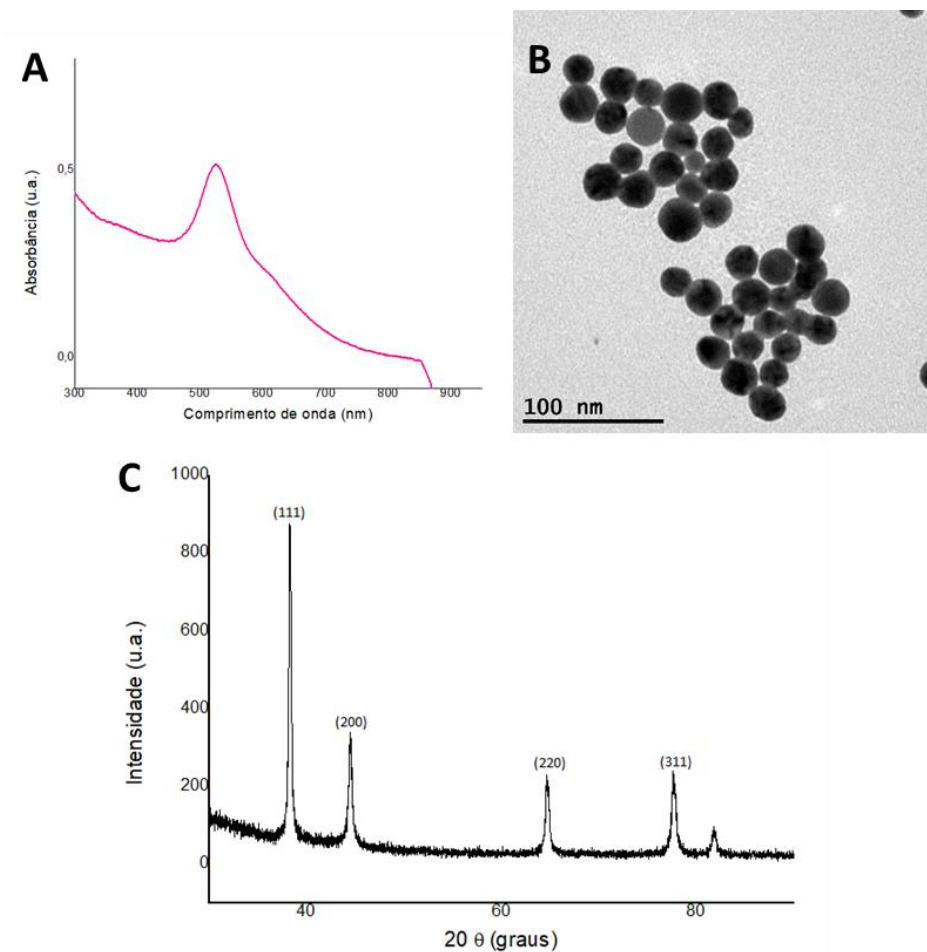


Figura 16. Caracterização espectroscópica das AuNPs: (A) Espectro UV-Vis das AuNPs, com presença do pico característico em 524 nm. (B) Imagens obtidas no MET. (C) Padrão de difração de raio X.

O potencial zeta é um indicador útil da carga superficial e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade das AuNPs. Quanto maior o potencial zeta mais provável que a suspensão seja estável pois as partículas carregadas se repelem umas às outras. AuNPs com potencial zeta maiores que +30mV e menores que -30mV são consideradas estáveis. Desse modo, um valor de potencial zeta mais distante de zero, implica em uma dispersão mais estável, enquanto valores mais baixos podem indicar instabilidade coloidal que pode levar à agregação⁵⁴. Na medida de potencial zeta das AuNPs foi encontrado um valor de -47,39 mV, demonstrando que as nanopartículas possuem carga superficial negativa, sendo estáveis e pouco agregadas. O espalhamento dinâmico da luz (DLS), ocorre quando uma solução é submetida a um feixe de luz monocromático, a luz se espalha em todas as direções em função do tamanho e da forma das moléculas a serem pesquisadas, fornecendo o tamanho das partículas dissolvidas na amostra⁵⁵. O resultado do ensaio de DLS indicou a formação

de nanopartículas com o diâmetro médio de 46 nm, o que difere consideravelmente dos valores preditos anteriormente, todavia, vale citar que a medida de DLS é capaz de determinar o tamanho do núcleo metálico e da nuvem de elétrons que o cerca, nesse caso o citrato de sódio, o que pode explicar a diferença dos valores encontrados pela medida pelo MET e RPS.

Tabela 1. Estimativa do diâmetro das AuNPs por diferentes técnicas.

Equipamento	Diâmetro estimado
DLS	46nm
UV-Vis/ RPS	~ 20nm
MET	~ 20nm

5.2 EFEITO DOS CO-SOLVENTES SOBRE A ESTABILIDADE DAS AUNPS

Aplicações específicas geralmente requerem a transferência de nanopartículas de um meio polar para um meio não polar, ou vice-versa, a fim de maximizar as vantagens oferecidas por esses ambientes. No caso do nosso estudo, se faz necessária a utilização de meios aquosos com co-solventes orgânicos, que possibilitam uma melhor solubilidade dos BODIPYs.

Diversas técnicas já foram descritas para transferência das nanopartículas de um ambiente polar para um não polar, sendo o método de Brust-Schiffirin o primeiro a ser descrito⁵⁶. Outros autores utilizaram ligantes na superfície das nanopartículas para realizar a mudança de fase e mantê-las estáveis⁵⁷. Outro estudo⁵⁸ verificou a estabilidade das AuNPs quando transferidas para o etanol sem o uso de ligantes.

A estabilidade das AuNPs pode ser avaliada medindo seu grau de agregação. Mudanças na agregação das nanopartículas irão alterar seu espectro da RPS, pois ocorre mudança no tamanho da nanopartícula e conseqüentemente alteração na interação com a luz visível. Dessa forma, avaliamos o espectro de absorção das AuNPs em diferentes sistemas aquosos contendo um dos seis co-solventes orgânicos selecionados, e analisamos se houve mudança no espectro da RPS. Observou-se que a transferência da AuNP para solução aquosa com a maioria dos co-solventes

pouco alterou o espectro da RPS. A exceção a essa observação foi a utilização do DMSO como co-solvente, onde notou-se o aparecimento de um pico da RPS próximo ao comprimento de onda 700 nm (Figura 17).

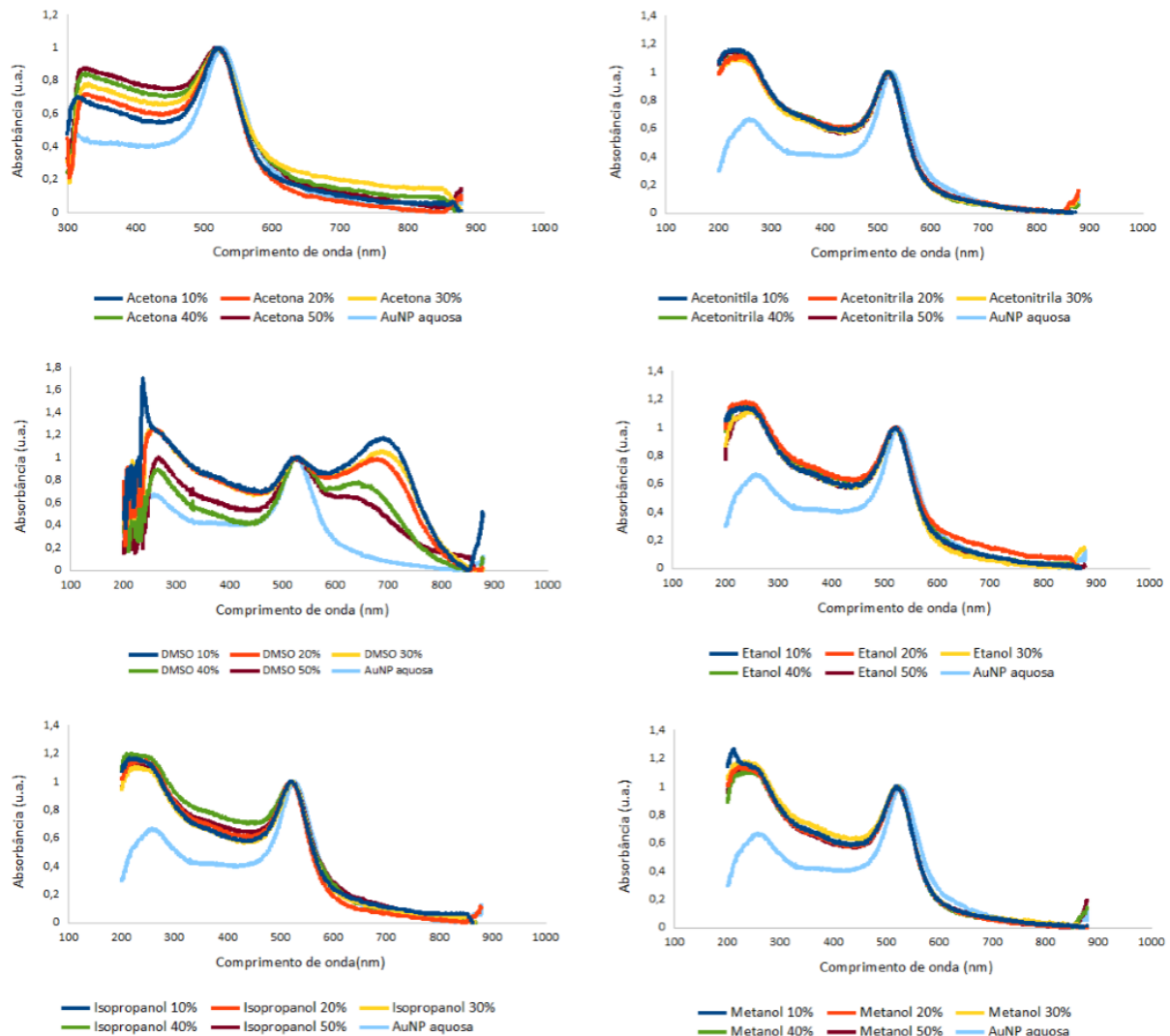


Figura 17. Espectros de absorção no UV-Vis das AuNPs em diferentes solventes e em concentrações variadas (10,20,30,40 e 50%).

É bem estabelecido que a cor do coloide está relacionada ao confinamento quântico dos elétrons dessas nanopartículas, logo, relacionados às mudanças na Ressonância de Plasmônica de Superfície. A cor das nanopartículas é originada da interação da radiação com os elétrons livres da banda de condução, entretanto, o tamanho das nanopartículas é menor que o comprimento de onda da luz visível. Deste modo, os processos de espalhamento e absorção da radiação apresentam uma dependência com o tamanho das partículas, que sofre alteração quando ocorre agregação das

AuNPs^{18,58}. Desta forma, as observações relatadas anteriormente evidenciam a formação de agregados quando se utiliza o DMSO como co-solvente.

Outro aspecto avaliado a fim de identificar o co-solvente que mantém as AuNPs estáveis, foi o parâmetro de floculação. Esse parâmetro é calculado a partir da integral da banda de absorção entre os comprimentos de onda 600–800 nm, e posteriormente plotado com a concentração dos solventes. A análise gráfica (Figura 18) nos permite visualizar de maneira mais clara os efeitos do co-solventes sobre a estabilidade da nanopartícula. Os resultados indicados confirmam a observação descrita anteriormente de que o DMSO altera a estabilidade das AuNPs, possivelmente devido ao grupo sulfóxido presente na sua estrutura. Interessante notar uma alteração menos óbvia para a acetona e o etanol. Aparentemente acetonitrila, metanol e isopropanol não afetaram a estabilidade das AuNPs, e, devido à alta solubilidade dos BODIPYs em acetonitrila, esta foi selecionada para os ensaios de conjugação eletrostática.

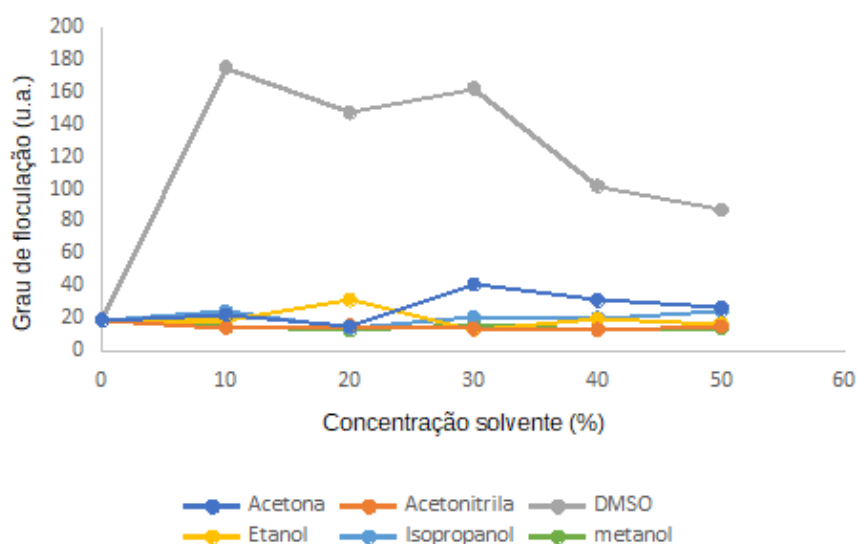


Figura 18. Parâmetro de floculação das AuNPs em diferentes solventes.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUORÓFOROS

Os fluoróforos selecionados para esse estudo foram caracterizados quanto às suas propriedades de absorção e emissão (Figura 19). Os dados de comprimento de onda de absorção máxima – $\lambda_{\text{máx(abs)}}$ – comprimento de onda de emissão máxima – $\lambda_{\text{máx(em)}}$ – e desvio de Stokes estão mostrados na tabela 2.

Para o composto **1**, foi encontrado o valor de absorção máxima de 507 nm, com emissão em 531 nm, obtendo um desvio de Stokes de 24 nm. Valores próximos aos

obtidos pelo nosso estudo foram encontrados em outro trabalho⁶⁰, onde foi testado o mesmo composto em acetonitrila pura, resultando em um pico de absorção em 508 nm e de emissão em 522 nm. A diferença no espectro de emissão pode ter sido causada pelo o uso da solução aquosa de acetonitrila utilizada pelo nosso trabalho. Para o composto **2** encontramos uma absorção máxima de 541 nm com um pico de emissão em 571 nm, resultando em um desvio de Stokes de 30 nm. Os compostos **1** e **2** se diferenciam pela presença de um anel nitrobenzeno na posição 3 do anel, responsável por promover esse desvio do espectro de absorção e emissão. Estudos anteriores⁶¹ encontraram valores próximos aos nossos em acetonitrila, de 540 e 564 nm para absorção e emissão respectivamente.

O composto **3** apresentou uma absorção máxima de 491 nm, com emissão de 518 nm e um desvio de Stokes de 27 nm. Recente estudo⁶², testou o composto **3** em outros solventes orgânicos e obteve os seguintes valores: em acetona pico de absorção em 495 nm e pico de emissão em 513 nm; em ciclohexano, pico de absorção em 504nm e de emissão em 515 nm; em metanol, pico de absorção em 492 nm e de emissão em 511 nm; em etanol, pico de absorção em 495 nm e de emissão em 512 nm. Nesse caso, pudemos observar que o meio onde o composto **3** de encontra solubilizado pode alterar levemente as suas propriedades fotofísicas, caracterizando o efeito de solvatocromismo.

O composto **4**, se diferencia do composto **3** pela presença de um átomo de cloro na posição 5 do anel. Os resultados da caracterização fotofísica indicam que a inserção do átomo de cloro na posição indicada resulta em um leve desvio batocrômico dos espectros de absorção e emissão, uma vez que observamos para **4** uma absorção máxima de 496 nm e emissão de em 528 nm com desvio de Stokes de 32 nm.

O composto **5**, apresenta absorção máxima de 481 nm, emissão em 501 nm e desvio de Stokes de 20 nm. Estudo anterior⁶³, testou o composto **5** em metanol, encontrando valores para absorção e emissão de 484 nm e 498 nm, respectivamente, mostrando novamente um pequeno solvatocromismo para essa substância. Interessante notar que os compostos **3** e **5**, se diferenciam pela presença de um grupo etil na posição 2 do anel, o que pode explicar o pequeno desvio hipsocrômico observado.

O composto **6**, apresenta absorção máxima de 487 nm, emissão em 512 nm e desvio de Stokes de 25 nm. Mais uma vez pudemos observar um leve efeito batocrômico da

absorção e da emissão associado à inserção do átomo de cloro na posição 5 quando comparamos as propriedades de **5** e **6**.

O composto **7**, apresenta absorção máxima em 556 nm, emissão em 581 nm e desvio de Stokes de 25nm. Em trabalho anterior do grupo³⁷, foi observado emissões entre 571 e 583 nm e absorções entre 547 e 557 nm, os valores variaram de acordo com o meio em que se encontrava solubilizado (acetato de etila, acetona, clorofórmio, diclorometano, DMSO, metanol e pentano). Os dados encontrados corroboram mais uma vez com o fenômeno do solvatocromismo. Vale notar que os compostos **2** e **7** se diferenciam pela do grupo isotiocianato como substituinte do anel e a presença do isotiocianato pode ser o responsável por promover o desvio batocrômico nos espectros de absorção e emissão.

Para o FITC, foi encontrado uma absorção em 478 nm, emissão em 526 nm e um desvio de Stokes de 48 nm. O composto foi solubilizado em uma solução de DMF 10%. Já a rodamina B foi solubilizada em água ultrapura e apresentou uma absorção e emissão máxima em 553 e 586 nm respectivamente e um desvio de Stokes de 33 nm.

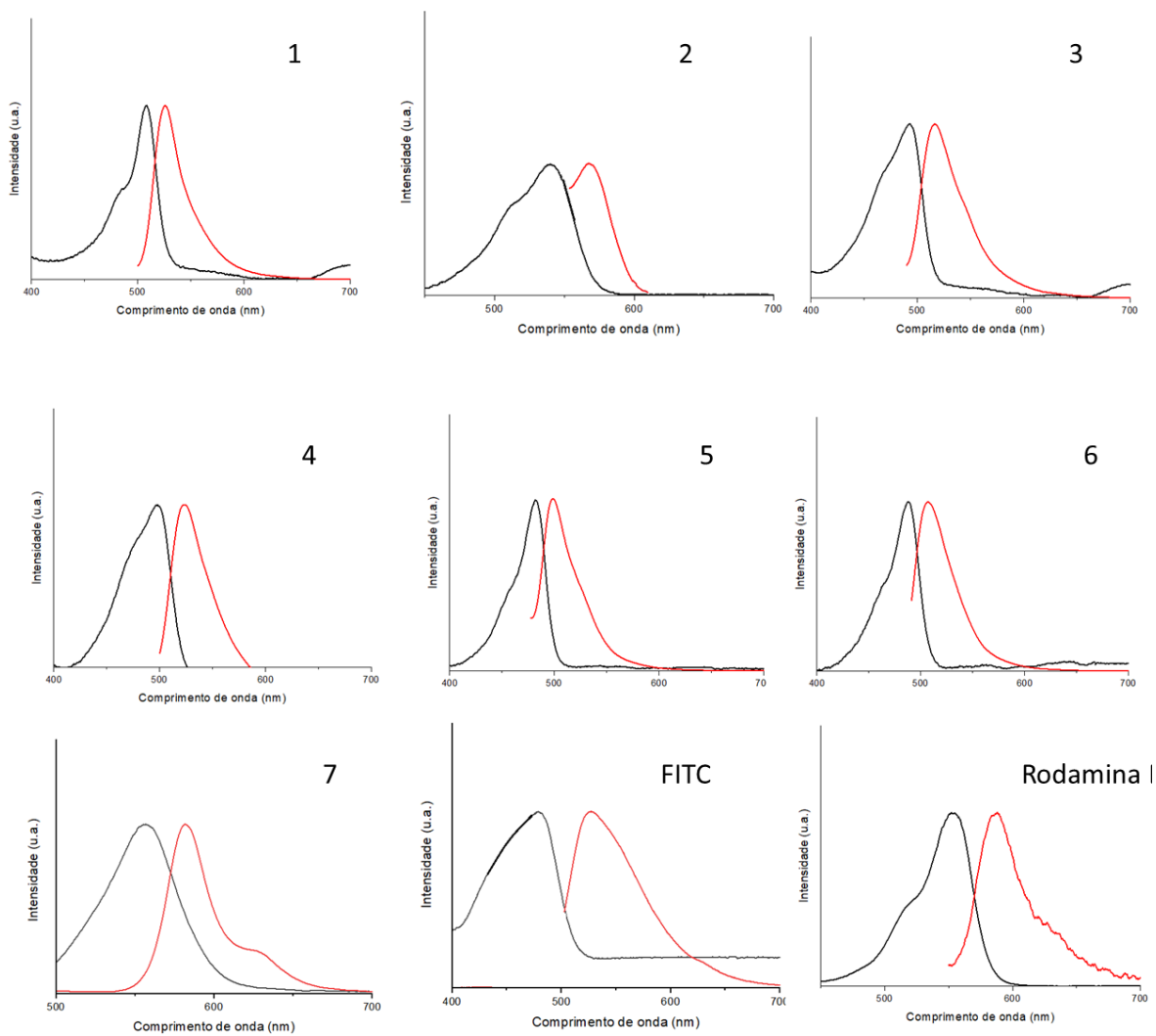


Figura 19. Espectro absorção e emissão dos compostos 1-7, Rodamina B e FITC livres. Absorção em preto e emissão em vermelho.

Tabela 2. Absorção e emissão máxima e desvio de Stokes dos compostos.

Composto	$\lambda_{\text{máx(abs)}}$	$\lambda_{\text{máx(em)}}$	Desvio de Stokes
Rodamina B	553 nm	586 nm	33 nm
FITC	478 nm	526 nm	45 nm
Composto 1	507nm	531nm	24 nm
Composto 2	541 nm	571 nm	30 nm
Composto 3	491 nm	518 nm	27 nm
Composto 4	496 nm	528 nm	32 nm
Composto 5	481 nm	501 nm	20 nm
Composto 6	487 nm	512 nm	25 nm
Composto 7	556 nm	581 nm	25 nm

5.4 CONJUGAÇÃO ELETROSTÁTICA AUNPS - FLUORÓFOROS 1 A 6

5.4.1 Determinação do tempo de conjugação com Rodamina B

A estrutura química da Rodamina B e as propriedades da superfície da AuNP indicam que pode existir uma interação entre do tipo eletrostática entre eles. A rodamina B possui carga positiva devido a um átomo de nitrogênio quaternário, enquanto a AuNP possui carga superficial negativa, favorecendo a interação eletrostática entre os compostos. A Rodamina B foi utilizada como padrão para determinação do tempo de conjugação, e os resultados obtidos nesse ensaio foram extrapolados e utilizados nas conjugações com os BODIPYs.

Após o ensaio e análise dos dados, observou-se que aproximadamente após 10 minutos do início da reação a concentração do sobrenadante diminui bastante, consequência da interação da Rodamina B com as AuNPs. Após 30 minutos de reação a concentração do sobrenadante se mantém relativamente constante, possivelmente devido a saturação da superfície das AuNPs (Figura 20). Dessa forma ficou estabelecido que um tempo de conjugação de 30 minutos é o suficiente para alcançar a conjugação, o que está de acordo com o tempo de reação encontrado na literatura⁶⁵. O resultado com a Rodamina B nos levou a realizar a conjugação das AuNPs com BODIPIYs pelo período de 30 minutos.

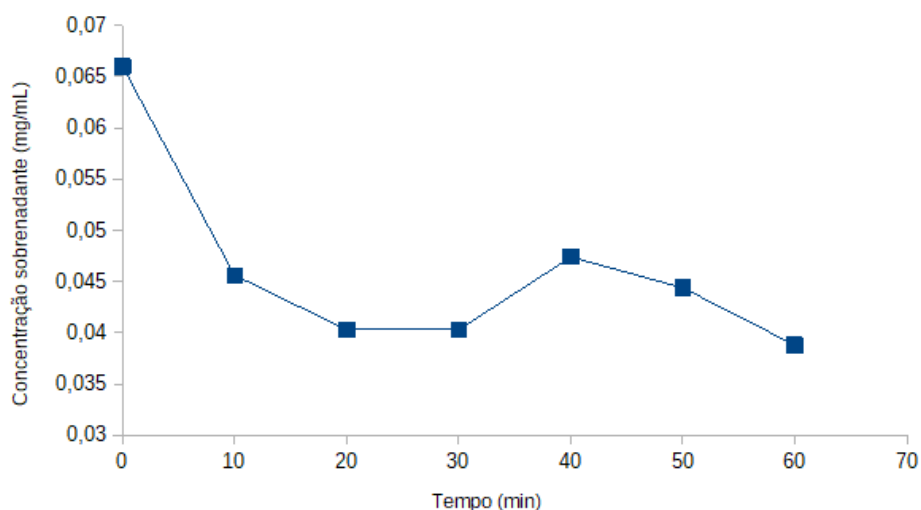


Figura 20. Determinação do tempo de conjugação com Rodamina B.

5.4.2 Caracterização do conjugado

Uma forma de confirmar a eficiência da conjugação entre as AuNPs e os fluoróforos é realizar a análise do espectro de absorção dos compostos livres e conjugados. Na tabela 3 relacionamos absorção e emissão máxima dos compostos livres e conjugados. Aparentemente o espectro de absorção indica somente a banda de absorção da RPS da nanopartícula de ouro, que parece se sobrepor à banda de absorção dos fluoróforos.

Os espectros de emissão dos BODIPYs quando conjugados à AuNP puderam ser observados, uma vez que a fluorescência da AuNP é negligenciável em comparação com a fluorescência dos BODIPYs. Geralmente, os BODIPYs são fluoróforos com rendimentos quânticos de fluorescência muito altos, enquanto o rendimento quântico de fluorescência das AuNPs é muito inferior⁶⁵.

A presença das AuNPs altera o comprimento de onda de emissão máxima dos compostos, um indicativo que a interação AuNP-BODIPY tem importante influência sobre a emissão da fluorescência dos compostos. Para o composto **1** observamos que a conjugação alterou o $\lambda_{\text{máx(em)}}$ de 531 nm para 523 nm. Para o composto **2** observamos que a conjugação alterou o $\lambda_{\text{máx(em)}}$ de 571 nm para 619 nm. Para o composto **3** observamos que a conjugação alterou o $\lambda_{\text{máx(em)}}$ de 518 nm para 512 nm. Para o composto **4** observamos que a conjugação alterou o $\lambda_{\text{máx(em)}}$ de 528 nm para 518 nm. Para o composto **5** observamos que a conjugação alterou o $\lambda_{\text{máx(em)}}$ de 501

nm para 495 nm. Para o composto **6** observamos que a conjugação alterou o $\lambda_{\text{máx(em)}}$ de 512 nm para 499 nm. Para a rodamina B observamos que a conjugação alterou o $\lambda_{\text{máx(em)}}$ de 586 nm para 574 nm.

Interessante notar que a conjugação não covalente com a nanopartícula de ouro parece causar um leve desvio hipsocrômico (inferior a 15 nm) na emissão de todos os BODIPYs e da Rodamina B, com exceção do BODIPY **2**. No caso do BODIPY **2** observamos um intenso desvio batocrômico de 48 nm no pico de emissão. Essa observação está pode estar relacionada com a presença do grupo nitro, que pode influenciar as interações com as AuNPs.

Tabela 3. Absorção e emissão dos fluoróforos livres e conjugados.

Composto	Composto Livre		Conjugado AuNP	
	$\lambda_{\text{máx(abs)}}$	$\lambda_{\text{máx(em)}}$	$\lambda_{\text{máx(abs)}^{\text{a}}}$	$\lambda_{\text{máx(em)}}$
Rodamina B	553nm	586nm	525 nm	574 nm
Composto 1	507nm	571 nm	523nm	619 nm
Composto 2	541 nm	571 nm	525 nm	619 nm
Composto 3	491 nm	518 nm	529 nm	512 nm
Composto 4	496 nm	528 nm	526 nm	519 nm
Composto 5	481 nm	501 nm	526 nm	495 nm
Composto 6	487 nm	512 nm	525 nm	499 nm

^aEsses valores indicam a banda de absorção da AuNP, uma vez que a banda de absorção dos fluoróforos foi sobreposta.

Após análise do espectro de absorção do coloide de ouro sintetizado e funcionalizado com os sete compostos, foram notados desvios do pico de RPS das AuNPs (figura 21), de 524 para 523 nm para o conjugado AuNP-Composto **1**; de 524 para 525 nm para o conjugado AuNP-Composto **2**; de 524 para 529 nm para o conjugado AuNP-Composto **3**, de 524 para 526 nm para o conjugado AuNP-Composto **4**, de 524 para 526nm para o conjugado AuNP-Composto **5**, de 524 para 525 nm para o conjugado AuNP-Composto **6** e de 524 para 525 nm para o conjugado AuNP-Rodamina B. Esses leves desvios batocrômicos no espectro da RPS podem resultar da conjugação da

AuNP com moléculas orgânicas, e podem indicar que ocorreu conjugação com os fluoróforos.

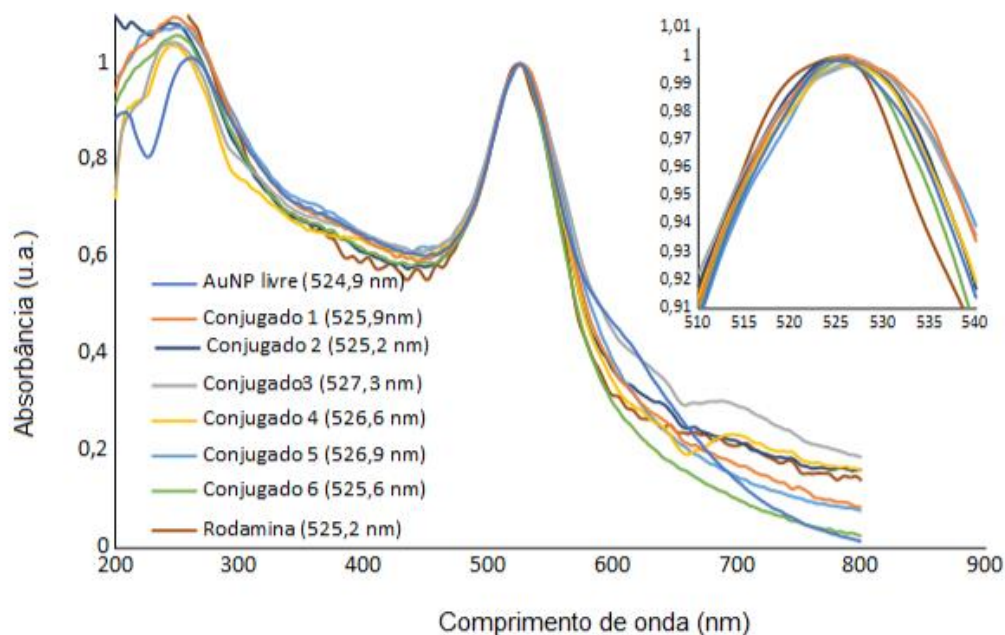


Figura 21. Espectro de absorção dos conjugados com AuNP-Fluoróforo orgânico. O leve desvio batocrômico pode ser observado no *inset* destacando o pico de absorção.

A confirmação da conjugação também foi realizada através da espectroscopia Raman. A espectroscopia Raman é uma técnica que envolve a medida da dispersão inelástica da energia do laser incidente na amostra. Como resultado, ocorre o aparecimento de picos espectrais, devido aos modos vibracionais da molécula, que são deslocados pela energia incidente, logo, a espectroscopia Raman fornece informações sobre simetria molecular e grupos funcionais em moléculas grandes e complexas⁶⁷. A Figura 22 traz os espectros de Raman das AuNPs e AuNPs conjugadas com os fluoróforos. Os picos presentes nos comprimentos de onda 1372, 1374 e 1376 cm^{-1} nos espectros dos compostos 1, 2 e 3 são referentes às vibrações do grupamento carboxila do citrato de sódio⁶⁷ utilizado na síntese das AuNPs e a manutenção do pico sugere que não houve substituição total de citrato pelos corantes. Porém, surgimento de picos em 922, 1185, 1325 e 2256 cm^{-1} para o Composto 1 sugere mudança na superfície das AuNPs após conjugação. Para o Composto 2 foram observados picos em 922 e 2256 cm^{-1} . Foi observado para o Composto 3, picos bem próximos aos encontrados no Composto 2, em 925 e 2256 cm^{-1} . Para os compostos 4, 5 e 6, notou-se semelhança entre os espectros, com o desaparecimento do pico em 1374 cm^{-1} , sugerindo então uma melhor substituição do grupamento

carboxila do citrato pelos corantes e a manutenção dos picos em 925 e 2257 cm^{-1} . Para a conjugação com a Rodamina B, nota-se a ausência do pico em 2257 cm^{-1} , presente nos demais compostos, bem como a presença de picos em 1185 cm^{-1} e em 1325 cm^{-1} , referente a curvatura C-C do anel aromático⁶⁸ podendo sugerir que houve modificação na superfície das AuNPs.

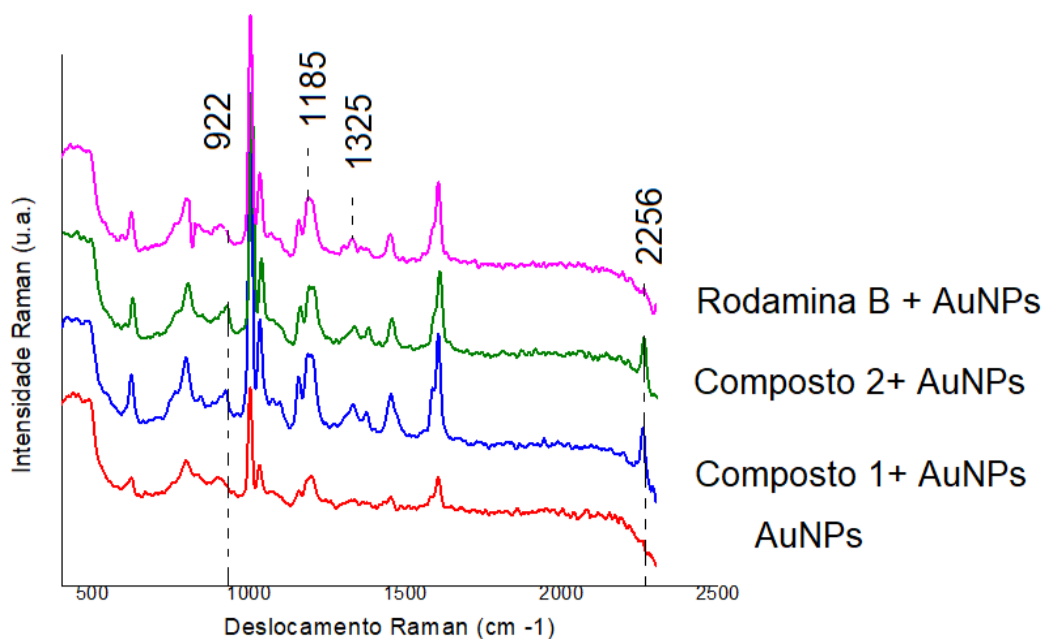


Figura 22. Espectroscopia Raman dos compostos 1-6 e rodamina B.

A figura 23 mostra os espectros de emissão de soluções dos fluoróforos livres e dos fluoróforos conjugados, nas quais a concentração do fluoróforo é a mesma. Foi observado que os compostos quando estão adsorvidos na superfície do metal tem a emissão da fluorescência diminuída. Os dados parecem indicar que as AuNPs se comportam como *quencher*s, ou seja, são capazes de suprimir a fluorescência dos compostos. Para o composto **1**, verificamos que a fluorescência integrada mostrou uma queda de 95,2% na emissão da fluorescência na presença das AuNPs. Já para o composto **2**, a diminuição da fluorescência integrada foi de 90,2%. Para o composto **3** observamos que a fluorescência integrada mostrou uma queda de 97,5%. Uma queda de 97,8% da fluorescência integrada foi verificada quando o composto **4** está conjugado na superfície das AuNPs. Para o composto **5** observamos que a fluorescência integrada apresentou uma queda de 90,3% e o para composto **6** uma queda 94,4%. Já a rodamina, verificamos uma queda de 83,4% na fluorescência integrada na presença das AuNPs.

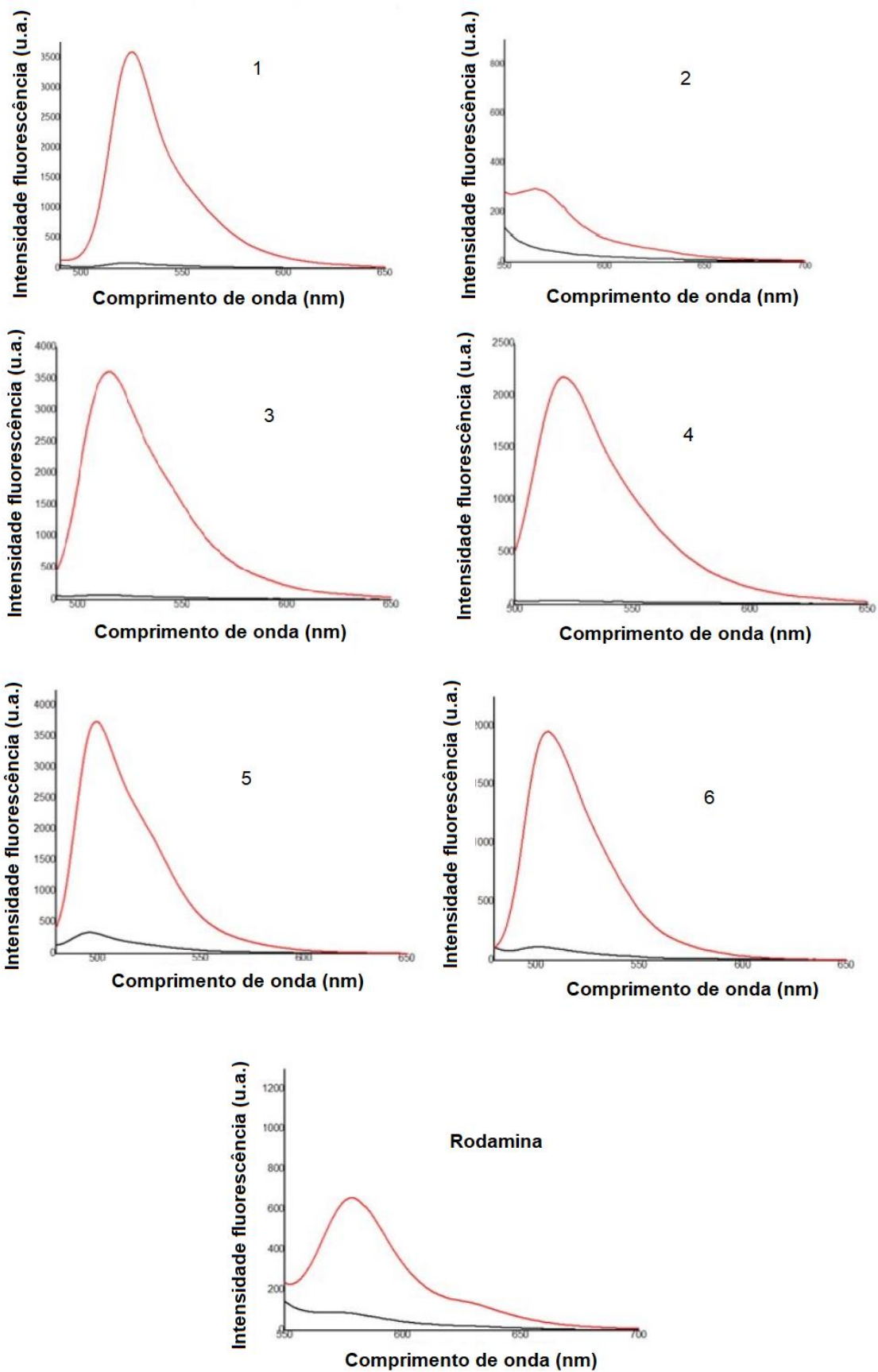


Figura 23. Espectroscopia de Fluorescência dos compostos 1-6 e rodamina B conjugados. Em preto os compostos conjugados com AuNP e em vermelho, os compostos livres.

Sabidamente, as AuNPs atuam como *quencher*s⁸ e estudos anteriores corroboram com nossos resultados^{3,69,70}. Neste caso, a extinção da fluorescência ocorre devido ao fenômeno de *Nanosurface energy transfer* (NSET), que assim como o *Forster ressonance energy transfer* (FRET), é a transferência de energia não radiativa entre dipolos, porém o aceitador de energia é uma superfície nanométrica, e este arranjo aumenta a probabilidade de transferência de energia e é responsável pela maior eficiência do NSET em relação ao FRET⁷¹. No caso da excitação da RPS, um pequeno dipolo no fluoróforo excitado induz um grande dipolo na partícula, levando a um aumento na eficiência de transferência de energia⁴⁴ (Figura 24).

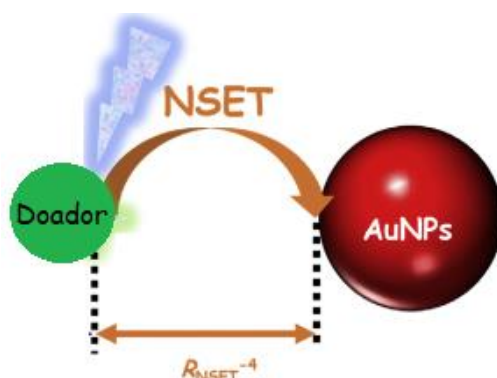


Figura 24. Esquema da transferência de energia por NSET⁷² adaptado pela autora

5.5 CONJUGAÇÃO COVALENTE AuNP COMPOSTO 7 E FITC

5.5.1 Caracterização do conjugado sem espaçador

Assim como feito para a conjugação eletrostática, foi realizada a espectroscopia de UV-Vis para confirmar a conjugação das AuNPs com o composto **7** e a FITC (Figura 25). Após análise do espectro de absorção do coloide de ouro sintetizado e funcionalizado com o composto **7** e FITC, foram notados desvios do pico de RPS das AuNPs. Observou-se um desvio espectral de 524nm da AuNP pura para 535 nm quando conjugada com o composto **7**. Esse desvio batocrômico na banda do RPS das AuNPs pode ser um indicativo que houve conjugação com o corante, uma vez que a adsorção na superfície das partículas altera seu índice de refração e conseqüentemente a banda do RPS. Já para conjugação com a FITC, houve um desvio hipsocrômico, de 524 nm para nm para 519 nm. Ainda que se trate de um de resultado inesperado, o desvio hipsocrômico também sugere que houve conjugação das AuNPs e o FITC.

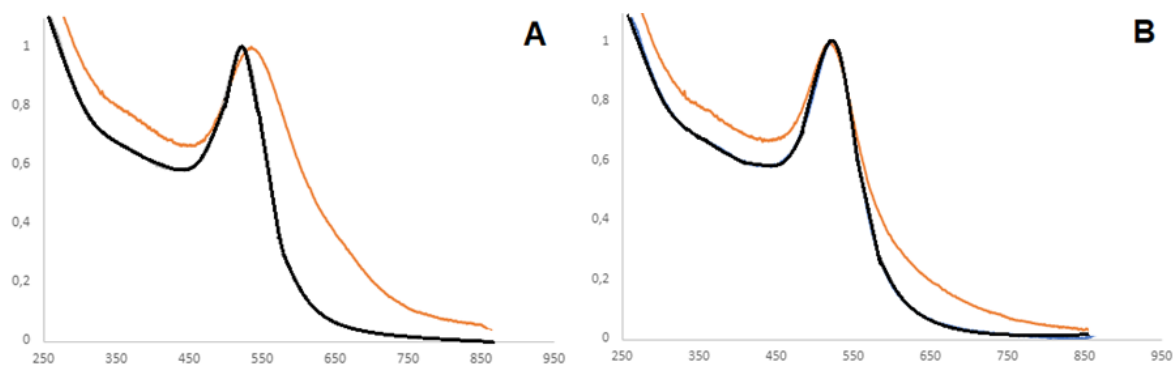


Figura 25. Espectro UV-Vis AuNPs livres e conjugadas. A) Composto 7; B) FITC. Em vermelho AuNP-fluoróforos e em preto, AuNP pura.

Com a espectroscopia de fluorescência (Figura 26) conseguimos mensurar a influência do metal na emissão da fluorescência. O cálculo da fluorescência integrada mostrou uma diminuição de 99,5% na emissão da fluorescência do composto 7 na presença do metal. Já o FITC demonstrou uma diminuição de 99,4% quando conjugado às AuNPs. Alguns trabalhos publicados anteriormente concordam com os dados encontrados para o FITC, onde as AuNPs exercem o papel de supressores da fluorescência, tendo sido aplicados no desenvolvimento de sensores⁷² e ensaios de imunocromatografia lateral⁴³. Outro estudo², utilizando um BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) 4-piridinil substituído, encontrou resultado semelhante ao nosso, ocorrendo também supressão da emissão da fluorescência. Nesse caso, o material conjugado foi aplicado como sensor de tióis intracelulares, explorando a tendência de ligação covalente entre o tiol e a AuNP que libera o fluoróforo.

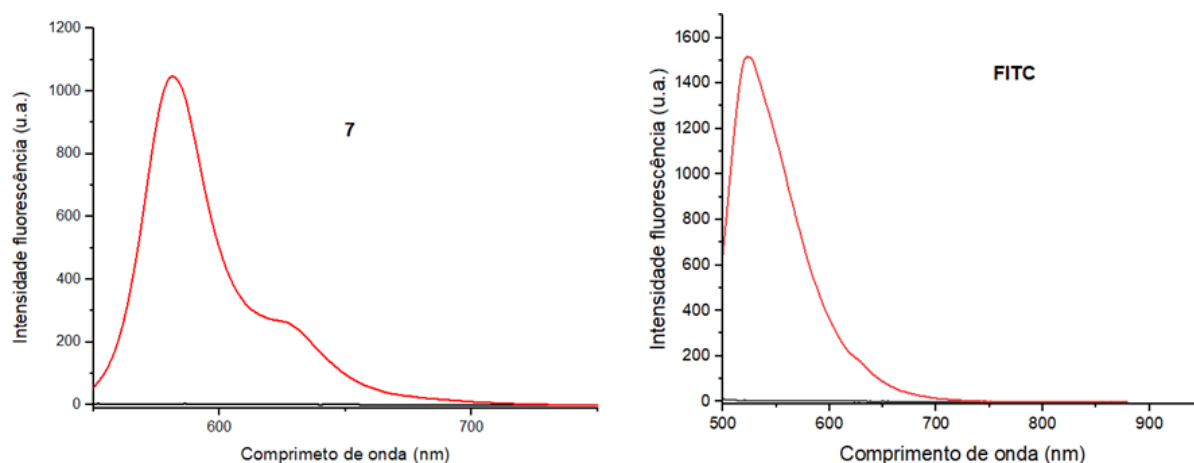


Figura 26. Espectroscopia de fluorescência das AuNPs conjugadas. A) Composto 7 e B) FITC. Em vermelhos os fluoróforos livres e em preto conjugado com AuNP. Os fluoróforos livres estão na mesma concentração presente na conjugação com as AuNPs.

5.5.2 Caracterização do conjugado usando cisteamina como espaçador

Para confirmação da reação e consequente conjugação do grupo isotiocianato dos corantes com o grupo amina da cisteamina também foram realizadas espectroscopia de UV-Vis e Raman. A análise dos espectros de absorção dos conjugados AuNP-Cis com os fluoróforos nos forneceu a seguinte resultado: para a conjugação AuNP-Cis e composto **7**, ocorreu um desvio batocrômico de 519 nm para 530 nm. Já para a conjugação AuNP-Cis e o FITC não houve alteração no pico banda da RPS, se mantendo em 519 nm, apresentando apenas um alargamento da banda (Figura 27B). Esses resultados indicam alteração na monodispersidade das AuNPs, uma vez que banda largas indicam polidispersidade das partículas, que pode ser consequência da alteração na superfície das partículas após a conjugação.

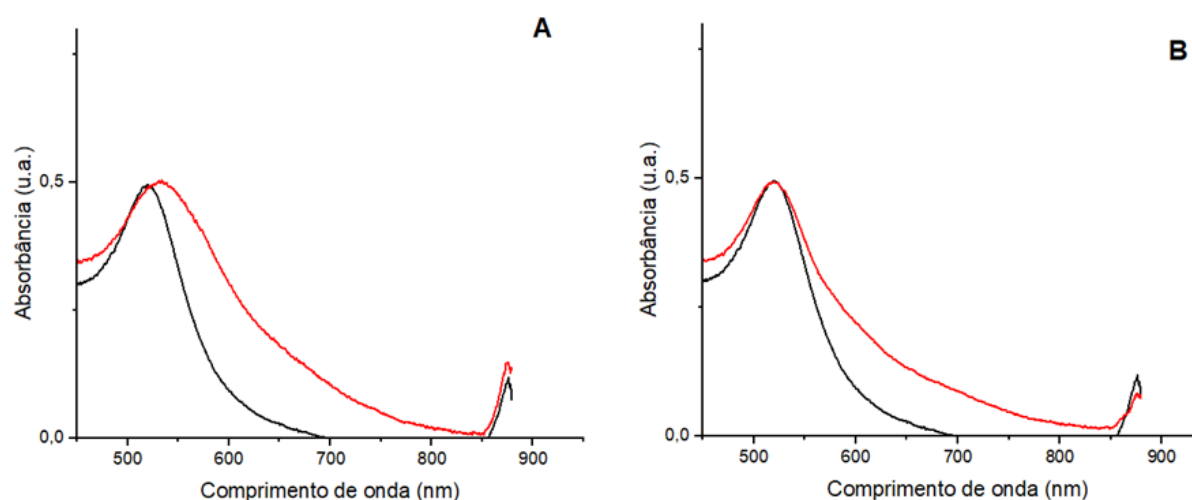


Figura 27. Espectro UV-Vis das AuNPs. A) AuNP-Cis composto **7** B) AuNP-Cis FITC. Em preto AuNP-Cis, e em vermelho AuNP-Cis-fluoróforo.

O resultado obtido também nos fornece comparação da conjugação com ou sem o uso de espaçador. Para AuNP-Composto **7**, foi obtido pico da RPS em 535nm, já na presença da cisteamina como espaçador, o pico observado foi em 530nm. Já para conjugação das AuNP-FITC e na presença do espaçador, obtivemos o pico em 519 nm em ambas as conjugações (Tabela 4). A presença do espaçador, que possui aproximadamente 0,5 nm de comprimento, aparentemente não alterou de maneira relevante o espectro da RPS das AuNPs conjugadas com FITC.

Tabela 4. Espectro UV-Vis dos compostos 7 e FITC, livres e conjugados.

Composto	$\lambda_{\text{máx(abs)}}$	$\lambda_{\text{máx(abs)}}$ AuNP-	$\lambda_{\text{máx(abs)}}$ AuNP-Cis
Composto 7	556 nm	535 nm	530 nm
FITC	478 nm	519 nm	519 nm

Com a espectroscopia de fluorescência (Figura 28) conseguimos mensurar a influência do metal na emissão da fluorescência. O cálculo da fluorescência integrada mostra uma diminuição de 99,8 % na emissão da fluorescência do composto **7** na conjugação com a AuNP-Cis. Já o FITC demonstrou uma diminuição de 99,8% quando conjugado às AuNPs-Cis. Neste caso, mesmo com a presença de um espaçador, a AuNP ainda foi observada a supressão da fluorescência dos compostos. Importante lembrar que o espaçador utilizado, a cisteamina, possui apenas dois carbonos na sua cadeia e aproximadamente 0,5 nm de comprimento, logo não se mostrou eficaz para manter a distância necessária para evitar a influência e supressão da fluorescência pelo metal. Neste caso, a possível explicação também é o fenômeno da NSET, onde ocorre a transferência de energia do fluoróforo (doador) para a AuNP, suprimindo então a fluorescência.

É possível supor que o comprimento do espaçador cisteamina não seja o suficiente para evitar a supressão da fluorescência, e dados da literatura dão suporte a essa tese. Recente estudo⁷³, mostrou que mesmo com o uso de um ligante de maior tamanho, como no caso do PEG para conjugação com FITC, ainda houve supressão da fluorescência, confirmando mais uma vez a forte característica supressora do metal.

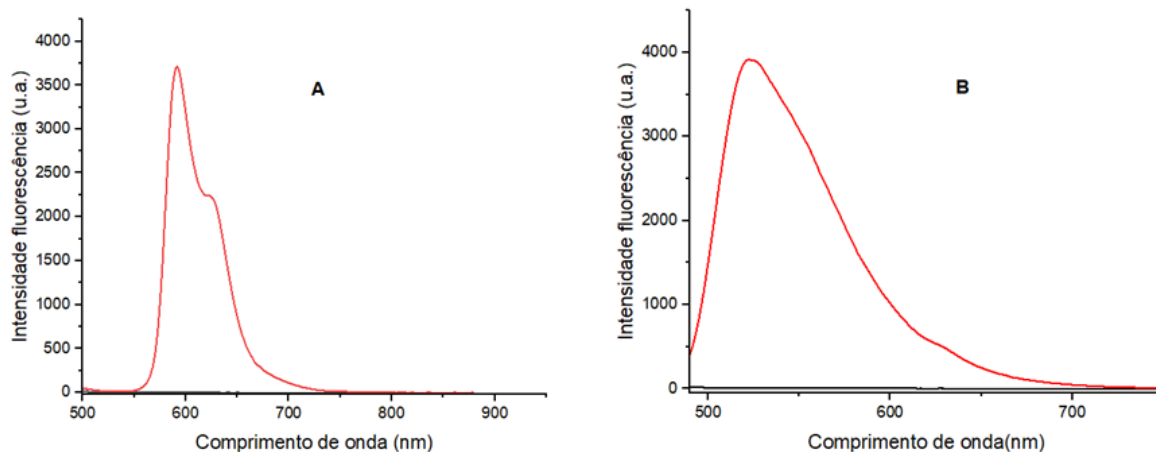


Figura 28. Espectroscopia de fluorescência das AuNP-Cis conjugada. A) Composto 7 e B) FITC. Em vermelho os fluoróforos livres e em preto conjugado com AuNP.

A espectroscopia de Raman, neste caso, sob o efeito da SERS forneceu a confirmação sobre moléculas adsorvidas na superfície das AuNPs. Para a conjugação com composto **7** (Figura 29A) é possível observar o aparecimento de novos picos nos espectros quando as AuNPs estão conjugadas com composto **7**. Nota-se também um padrão distinto do espectro na conjugação da AuNP-Cis com o corante. Após a conjugação, observa-se a atenuação dos picos em 907 e 1639 cm^{-1} presentes apenas na AuNP pura, fato que sugere modificação na superfície das NPs. A presença de picos em 669 e 1112 cm^{-1} nos espectros da AuNP-Composto **7** e AuNP-Cis-composto **7** também sugerem modificação na superfície das NPs. Os picos em 1354 e 1600 cm^{-1} , presentes apenas nas amostras conjugadas também indicam alteração na superfície das AuNPs. Já para a conjugação com o FITC (Figura 29B) também foi notado o aparecimento de picos distintos nos espectros das amostras. A atenuação do pico em 907 cm^{-1} , no espectro das AuNPs puras, após a conjugação, sugere que houve modificação na superfície das NPs. Nota-se um leve desvio no pico em 1639 cm^{-1} após a conjugação, mais uma vez indicando uma possível conjugação das AuNP com o corante. O aparecimento de picos nos espectros após a conjugação em $665, 869, 1120$ e 1420 cm^{-1} , também sugerem que houve alteração na superfície das AuNPs.

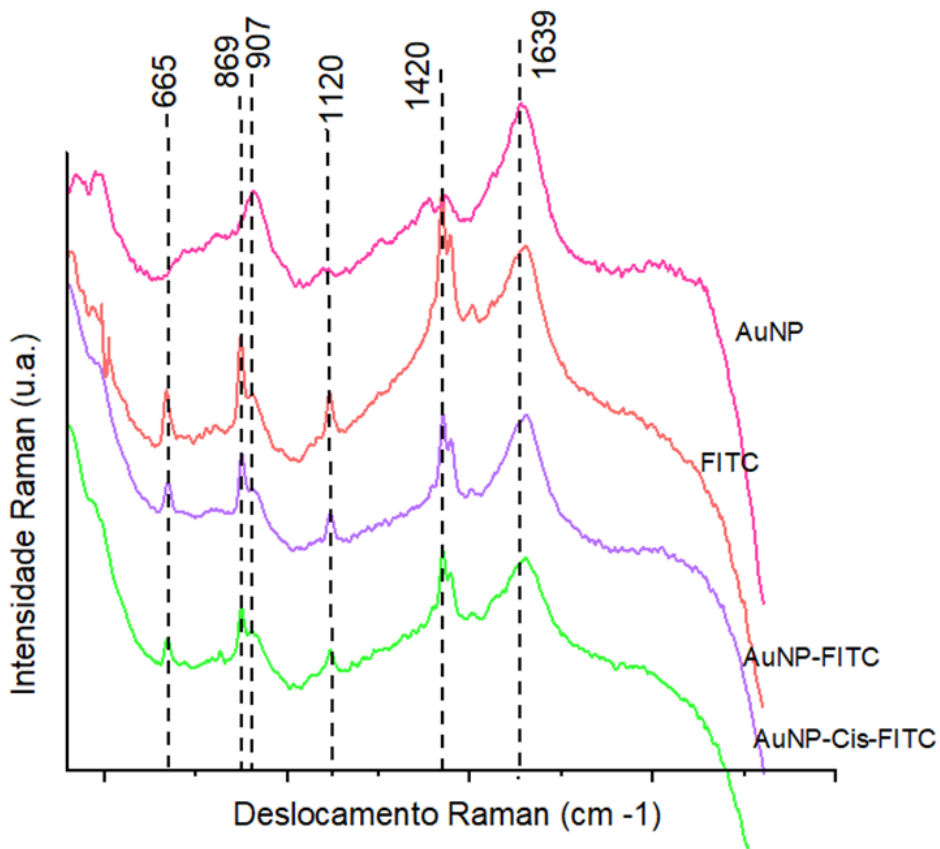
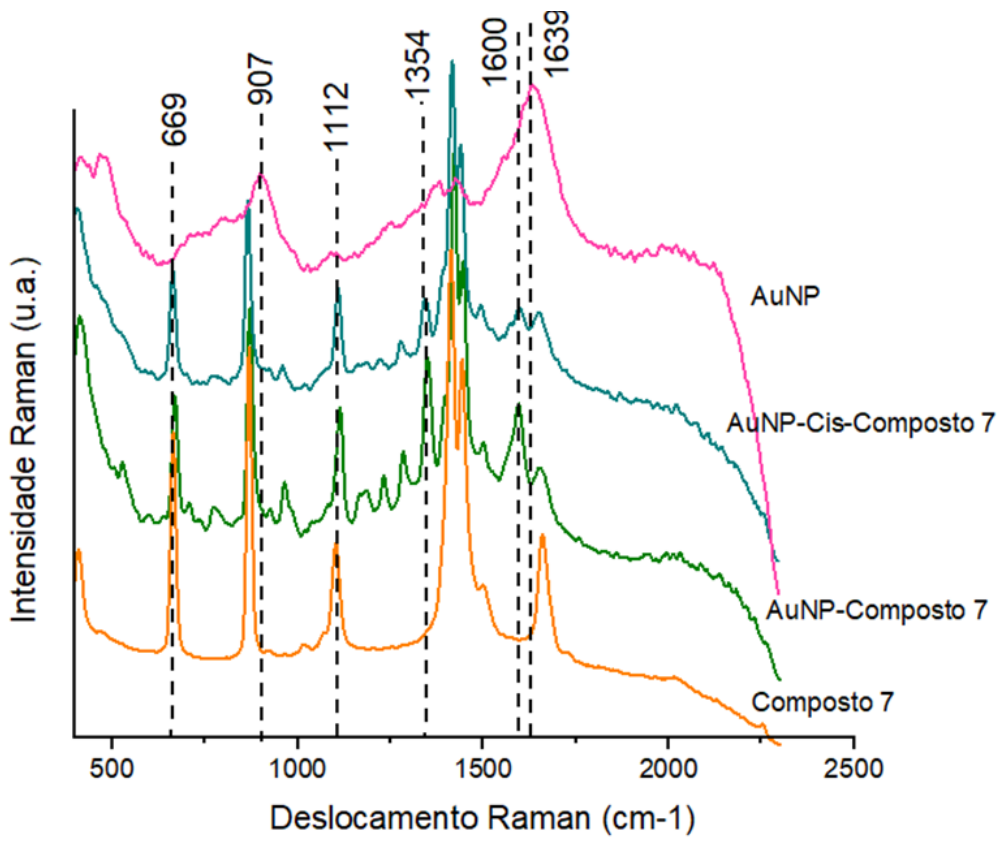


Figura 29. Espectroscopia Raman dos conjugados. A) Composto 7 B) FITC.

6) CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho concluímos que é possível realizar a conjugação de AuNPs com fluoróforos orgânicos através de interação eletrostática e ligação covalente. Foi possível observar também que a presença das AuNPs foi capaz de suprimir a emissão de fluorescência dos compostos de 83,4 a 99,8%, sendo que a conjugação dos compostos por meio de ligação covalente foi responsável por uma redução maior da emissão da fluorescência. Foi possível concluir que a utilização do espaçador não interferiu no efeito supressor do metal, provavelmente pois o tamanho da molécula de cisteamina não foi eficaz em manter o fluoróforo a uma distância da AuNP necessária para que não houvesse supressão da emissão da fluorescência.

Diante das conclusões, o grupo tem perspectiva de testar um espaçador maior afim de testar a influência da distância entre AuNP e fluoróforo na emissão da fluorescência. Existem substâncias disponíveis comercialmente que poderiam ser testadas, como o 6-amino-1-hexanotiol e o 8-amino-1-octanotiol, comercializados pela Sigma-Aldrich, todavia o alto custo destes materiais ainda é um impeditivo para o grupo de pesquisa. Diante da redução da fluorescência e da conhecida afinidade entre AuNP e tióis, é possível vislumbrar a aplicação de alguns dos materiais desenvolvidos como sensores de tióis, sendo eles capazes de deslocar os fluoróforos ligados às AuNPs, reestabelecendo a fluorescência ². Por fim, a baixa solubilidade dos BODIPYs em meio aquoso foi um problema comumente enfrentado pelo nosso grupo de pesquisa e pode interferir nas suas aplicações. Diante disso, o grupo de pesquisa vem estudando a possibilidade de investir na funcionalização de BODIPYs com grupos polares carregados para o desenvolvimento de sondas fluorescentes hidrossolúveis.

7) REFERÊNCIAS

1. LEE, Hye Young et al. BODIPY-functionalized gold nanoparticles as a selective fluoro-chromogenic chemosensor for imaging Cu²⁺ in living cells. **Analyst**, v. 135, n. 8, p. 2022–2027, 2010
2. XU, Jian et al. A gold nanoparticle-based fluorescence sensor for high sensitive and selective detection of thiols in living cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 1–7, 5 jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095656631530333X>>. Acesso em: 31 mar. 2021.
3. DONG, Liang et al. Highly Sensitive Fluorescent Sensor for Cartap Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Gold Nanoparticles and Rhodamine B. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 4, p. 2441–2449, 10 nov. 2017.
4. YAO, Yingyi et al. Reverse fluorescence enhancement and colorimetric bimodal signal readout immunochromatography test strip for ultrasensitive large-scale screening and postoperative monitoring. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 35, p. 22963–22970, 7 set. 2016.
5. ZHANG, Jian; LAKOWICZ, Joseph R. Metal-enhanced fluorescence of an organic fluorophore using gold particles. **Optics Express**, v. 15, n. 5, p. 2598, 5 mar. 2007. Disponível em: <<https://www.osapublishing.org/viewmedia.cfm?uri=oe-15-5-2598&seq=0&html=true>>. Acesso em: 6 abr. 2021.
6. KOZIELEWICZ, Paweł et al. A NanoBRET-based binding assay for smoothed allows real-time analysis of ligand binding and distinction of two binding sites for BODIPY-cyclopamine. **Molecular Pharmacology**, v. 97, n. 1, p. 23–34, 1 jan. 2020.
7. YANG, Yan et al. A Cell-Surface-Specific Ratiometric Fluorescent Probe for Extracellular pH Sensing with Solid-State Fluorophore. **ACS Sensors**, v. 3, n. 11, p. 2278–2285, 26 nov. 2018.
8. LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Springer Science & Business Media: 2006.
9. GEDDES, Chris D.; LAKOWICZ, Joseph R. **Metal-Enhanced Fluorescence**. jun. 2002, [S.l.: s.n.], jun. 2002. p. 121–129.

10. NANOTECHNOLOGY COORDINATION OFFICE, National. **Nanotechnology: Big Things from a Tiny World**. . [S.l: s.n.], [s.d.].
11. U. Kreibig and M. Vollmer, **Optical Properties of Metal Clusters** ,Springer, Berlin, 1995
12. MIKAMI, Yusuke et al. **Catalytic activity of unsupported gold nanoparticles**. **Catalysis Science and Technology**. [S.l.]: The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/cy/c2cy20068f>>. Acesso em: 5 abr. 2021, 6 jan. 2013
13. POLTE, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. The Royal Society of Chemistry. 2015; 17: 6809-6830
14. SHAWN JT, Campolongo MJ, Luo D, Cheng W. Building plasmonic nanostructures with DNA. *Nature Nanotechnology*. 2011, 6, 268–276.
15. ZHAO, Pengxiang; LI, Na; ASTRUC, Didier. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 3–4, p. 638–665, fev. 2013.
16. AMENDOLA, Vincenzo; MENEGHETTI, Moreno. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 11, p. 4277–4285, 19 mar. 2009.
17. Faraday M. The bakerian lecture: Experimental relations of gold (and other metals) to light, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 1857, 147, 145–181.
18. MIE, Gustav. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. **Annalen der Physik**, v. 330, n. 3, p. 377–445, 1908.
19. TURKEVICH, J.; GARTON, G.; STEVENSON, P. C. The color of colloidal gold. **Journal of Colloid Science**, v. 9, n. SUPPL. 1, p. 26–35, 1954.
20. AVILA, S R **Atividade antibacteriana e citotóxica de nanopartículas de ouro sintetizadas com Epigallocatequina 3-galato (EGCG)** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós graduação em Biotecnologia, 2020.
21. JAWORSKA, Aleksandra et al. Rhodamine 6G conjugated to gold nanoparticles as labels for both SERS and fluorescence studies on live endothelial cells. [s.d.]. Disponível em: <www.biotek.com>.
22. HUANG, hicheng; LIU, Biwu; LIU, Juwen. Parallel Polyadenine Duplex Formation at Low pH Facilitates DNA Conjugation onto Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 32, n. 45, p. 11986–11992, 15 nov. 2016. Disponível em:

- <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.langmuir.6b03253>>. Acesso em: 8 abr. 2021
23. OLIVEIRA, J. et al. Impact of conjugation strategies for targeting of antibodies in gold nanoparticles for ultrasensitive detection of 17 β -estradiol. [s.d.]. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>.
 24. GHOSH, Partha et al. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [S.l: s.n.], 17 ago. 2008
 25. Lin S Y, Tsai Y T, Chen C C, Lin C M, Chen C H. Two-step functionalization of neutral and positively charged thiols onto citrate-stabilized Au nanoparticles. *J. Phys. Chem.* 2004a, B108:2134–2139
 26. MOSIER-BOSS, Pamela A. Review of SERS substrates for chemical sensing. **Nanomaterials**, v. 7, n. 6, 8 jun. 2017.
 27. MCNAY, Graeme et al. focal point review Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. [s.d.].
 28. ZHANG, L. M.; UTTAMCHANDANI, D. Optical Chemical Sensing Employing Surface Plasmon Resonance. **Electronics Letters**, v. 24, n. 23, p. 1469–1470, 1988.
 29. VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: principles and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
 30. SINGH, Devender et al. Recent Advancements in Luminescent Materials and their Potential Applications. **Advanced Magnetic and Optical Materials**, p. 317–352, 12 dez. 2016.
 31. REZENDE, L. C. D. **Síntese caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do BODIPY**. 2016. 172 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-23052016-103608/publico/Tese_Completa_corrigida.pdf. Acesso em: 10 ago. 2019
 32. STOKES, G. G. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Londres*, v. 142, pp. 463-562, 1852. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rstl.1852.0022>. Acesso em: 20 nov. 2020

33. LLANO, Rebeca Sola et al. Tailoring the Photophysical Signatures of BODIPY Dyes: Toward Fluorescence Standards across the Visible Spectral Region. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74848>>. Acesso em: 10 jul. 2021
34. OSORIO-MARTÍNEZ, Carlos A et al. 8-AminoBODIPYs: Cyanines or Hemicyanines? The Effect of the Coplanarity of the Amino Group on Their Optical Properties. [s.d.].
35. ZIESSEL, Raymond et al. Isocyanate-, Isothiocyanate-, Urea-, and Thiourea-Substituted Boron Dipyrromethene Dyes as Fluorescent Probes. 2006.
36. MALATESTI, Nela et al. Isothiocyanato Boron Dipyrromethenes-The First BODIPY Analogues of Fluorescein Isothiocyanate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 746–749, 2006.
37. AMORIM, Vanessa G. et al. Synthesis and characterization of two novel red-shifted isothiocyanate BODIPYs and their application in protein conjugation. **Dyes and Pigments**, v. 182, 1 nov. 2020.
38. DREXHAGE, K. H. Influence of a dielectric interface on fluorescence decay time. **Journal of Luminescence**, v. 1–2, n. C, p. 693–701, 1970.
39. DENG, Wei et al. Metal-enhanced fluorescence in the life sciences: Here, now and beyond. *Physical Chemistry Chemical Physics*. [S.l.: s.n.], 14 out. 2013
40. JEONG, Yoon et al. Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: General approaches and a review of recent developments. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 111, p. 102–116, 15 jul. 2018.
41. ZHANG, Jian; LAKOWICZ, Joseph R. Metal-enhanced fluorescence of an organic fluorophore using gold particles. **Optics Express**, v. 15, n. 5, p. 2598, 5 mar. 2007. Disponível em: <<https://www.osapublishing.org/viewmedia.cfm?uri=oe-15-5-2598&seq=0&html=true>>. Acesso em: 6 abr. 2021.
42. RAY, Krishanu; BADUGU, Ramachandram; LAKOWICZ, Joseph R. Distance-Dependent Metal-Enhanced Fluorescence from Langmuir–Blodgett Monolayers of Alkyl-NBD Derivatives on Silver Island Films. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 22, n. 20, p. 8374, 26 set. 2006. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC2737395/](https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la061837a)>. Acesso em: 29 set. 2021.
43. WANG, Jidong et al. FRET on lateral flow test strip to enhance sensitivity for detecting cancer biomarker. **Talanta**, v. 176, p. 444–449, 1 jan. 2018.

44. GRIFFIN, Jelani et al. Size- and distance-dependent nanoparticle surface-energy transfer (NSET) method for selective sensing of hepatitis C virus RNA. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 2, p. 342–351, 2 jan. 2009.
45. JENNINGS, T L; SINGH, M P; STROUSE, G F. Fluorescent Lifetime Quenching near d) 1.5 nm Gold Nanoparticles: Probing NSET Validity. 2006.
46. KRISHNA DARBHA, Gopala; RAY, Anandhi; CHANDRA RAY, Paresh. Gold Nanoparticle-Based Miniaturized Nanomaterial Surface Energy Transfer Probe for Rapid and Ultrasensitive Detection of Mercury in Soil, Water, and Fish. v. 1, n. 3, p. 24, 2018. Disponível em: <www.acsnano.org>. Acesso em: 28 set. 2021.
47. BATTISTINI, Gionata et al. The Erratic Emission of Pyrene on Gold Nanoparticles. v. 2, n. 4, p. 77–84, 2008. Disponível em: <www.acsnano.org>. Acesso em: 28 set. 2021.
48. YUN, C. S. et al. Nanometal surface energy transfer in optical rulers, breaking the FRET barrier. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 9, p. 3115–3119, 9 mar. 2005.
49. GEDDES, C D **Metal-enhanced fluorescence** 1ed. Wiley, 2010
50. LAKOWICZ, Joseph R et al. **Radiative decay engineering: the role of photonic mode density in biotechnology**. **J. Phys. D: Appl. Phys.** [S.l.: s.n.], 2003.
51. OLIVEIRA J. **Estudo da síntese de nanopartículas de ouro e bioconjugação com proteínas para desenvolvimento de nanossensores**. Tese (Doutorado) Rede Nordeste de Biotecnologia –Renorbio Universidade Federal Do Espírito Santo –UFES. Programa de Pós-Graduação Em Biotecnologia. 2016
52. WOLFGANG HAISS, *, †, ‡ et al. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 1 jun. 2007. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0702084>. Acesso em: 30 ago. 2021.
53. BUNACIU, Andrei A.; UDRIȘTIOIU, Elena gabriela; ABOUL-ENEIN, Hassan Y. **X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications**. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 2 out. 2015
54. CLOGSTON, Jeffrey D.; PATRI, Anil K. Zeta potential measurement. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 697, p. 63–70, 2011
55. STETEFELD, Jörg; MCKENNA, Sean A; PATEL, Trushar R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. [s.d.].

56. BRUST, Mathias et al. Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. **J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN**, 1994.
57. ZHAO, Shi-Yong et al. Preparation, Phase Transfer, and Self-Assembled Monolayers of Cubic Pt Nanoparticles. 2002.
58. LIAO, Jianhui et al. Linear aggregation of gold nanoparticles in ethanol. [s.d.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/colsurfa>. Acesso em: 8 jul. 2021.
59. HORVATH, Helmuth. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v. 110, n. 11, p. 787–799, jul. 2009
60. WANG, Lina et al. UV-vis spectroscopy of the coupling products of the palladium-catalyzed C-H arylation of the BODIPY core. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 12, n. 5, p. 835–847, 2013.
61. VERBELEN, B. **Efficient synthesis of novel bodipy dyes via c-h functionalization**. Tese (Doutorado em Ciências) KU Leuven, Science, Engineering & Technology, Leuven, Bélgica. p.222, 2015
62. BAÑUELOS-PRIETO, Jorge et al. Controlling optical properties and function of BODIPY by using asymmetric substitution effects. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, n. 47, p. 14094–14105, 17 dez. 2010
63. LAINE, M. et al. Synthesis, structural, spectroscopic, computational and cytotoxic studies of BODIPY dyes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 238, p. 548–555, 1 jan. 2017.
64. TSENG, Mei Hui; HU, Cho Chun; CHIU, Tai Chia. A fluorescence turn-on probe for sensing thiodicarb using rhodamine B functionalized gold nanoparticles. **Dyes and Pigments**, v. 171, 1 dez. 2019.
65. CHENG, Yuqing et al. Luminescence quantum yields of gold nanoparticles varying with excitation wavelengths. **Nanoscale**, v. 8, n. 4, p. 2188–2194, 28 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/nr/c5nr07343j>>. Acesso em: 6 abr. 2021.
66. Introductory Raman Spectroscopy (Second edition) Elsevier, 2003 Author: John R. Ferraro, Kazuo Nakamoto and Chris W. Brown ISBN: 978-0-12-254105-6
67. HERNÁNDEZ-CASTILLO, M. I. et al. Surface-enhanced Raman scattering of the adsorption of pesticide endosulfan on gold nanoparticles. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 50, n. 8, p. 584–589, 3 ago. 2015.

68. LIN, Shuang et al. Rapid and sensitive SERS method for determination of Rhodamine B in chili powder with paper-based substrates. **Analytical Methods**, v. 7, n. 12, p. 5289–5294, 21 jun. 2015.
69. TSENG, Mei Hui; HU, Cho Chun; CHIU, Tai Chia. A fluorescence turn-on probe for sensing thiodicarb using rhodamine B functionalized gold nanoparticles. **Dyes and Pigments**, v. 171, 1 dez. 2019.
70. ZHOU, Bin et al. Fluorescent resonance energy transfer of organic fluorescent dyes with gold nanoparticles and their analytical application. **Gold Bulletin**, v. 51, n. 4, p. 145–151, 1 dez. 2018.
71. CHEN, Chi; HILDEBRANDT, Niko. Resonance energy transfer to gold nanoparticles: NSET defeats FRET. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 1 fev. 2020
72. HORMOZI-NEZHAD, M. Reza et al. Highly sensitive turn-on fluorescent detection of captopril based on energy transfer between fluorescein isothiocyanate and gold nanoparticles. **Journal of Luminescence**, v. 134, p. 874–879, 1 fev. 2013.
73. LOUMAIGNE, Matthieu et al. Fluorescence correlation spectroscopy reveals strong fluorescence quenching of FITC adducts on PEGylated gold nanoparticles in water and the presence of fluorescent aggregates of desorbed thiolate ligands. [s.d.]. Disponível em: <www.rsc.org/pccp>