

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

Rayssa Helena Arruda Pereira

**Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada  
(LSPR) em Dispersões Coloidais de Ouro para  
Detecção de Ocratoxina A**

Vitória  
2016

Rayssa Helena Arruda Pereira

**Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada  
(LSPR) em Dispersões Coloidais de Ouro para  
Detecção de Ocratoxina A**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães

Vitória  
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada  
(LSPR) em Dispersões Coloidais de Ouro para  
Detecção de Ocratoxina A**

**Rayssa Helena Arruda Pereira**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em Março de 2016 por:

---

**Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães- Orientador, UFES**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem – Membro Interno**

---

**Prof. Dr. André Romero da Silva - Membro Externo**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
Vitória, março de 2016

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Marco Cesar Cunegundes Guimarães, por todo apoio e confiança. Pelas conversas, as dicas, a atenção, o respeito e simplicidade dispensados em nossos encontros.

Aos Professores André Romero da Silva, Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem por aceitarem estar nessa banca e por se disporem a contribuir com este trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da UFES , pela oportunidade concedida neste centro de pesquisa e pelos encontros acadêmicos cuidadosamente preparados.

Ao meu amigo e tutor, Adilson Ribeiro Prado, pelos conhecimentos passados, pelo apoio intelectual e emocional, pela disponibilidade e pelo esforço desempenhado para o meu crescimento acadêmico.

Aos meus caros amigos, Jairo, Wanderson, Bárbara, Débora, Danilo , Ingrid, Afrânio , Flávia, Tadeu, Hélio, Gabriela, Suely, Andressa e Camila, pelas preocupações compartilhadas, pelos bate-papos agradabilíssimos, por compartilharem as apreensões e o conhecimento bem como pelo acolhimento e amizade incondicionais e espontâneos.

Aos demais colegas do PPGBF Gabi, Tamara, Eric, Johnathan, Tassiane, Bruna e Willyan, pelo companheirismo, pelas preocupações e alegrias compartilhadas durante as disciplinas.

À Kelly, pela prontidão e solicitude no desempenho das atividades da secretaria. Sempre disposta a ajudar e esclarecer.

Aos Professores, Breno Valentim Nogueira, Hélder Mauad e Ricardo Pinto Schuenck que jamais me negaram qualquer apoio ou pedido durante esse processo e pelo exemplo de dedicação à ciência.

Aos meus queridos e amados pais, Vinícius e Maristela, pelo incentivo, pelo apoio material e emocional, pela persistência, pelo carinho e amor. Obrigada por serem a minha inspiração de ser humano e de vida! E vou ter que repetir: Agradeço-lhes também por, em todas as vezes que nos falávamos, nunca esquecer-se de me perguntar: “*Tá precisando de alguma coisa, minha filha?*” Obrigada!

Ao meu amado esposo, Esthefano, por ser o meu maior companheiro, meu apoiador e amor da minha vida. Você foi fundamental para as minhas escolhas. Obrigada!

Aos meus amados irmãos Vinícius e Patrícia, por terem sido meus companheiros, por sempre torcerem por mim e por me orgulharem tanto. Diante da existência de vocês, tudo é mais bonito!

Aos meu queridos e amados avós, Eudete e João, obrigada pelo apoio incondicional, pelo amor e inspiração de vida!

À minha querida avó Thereza por sempre torcer por mim, pelo apoio e carinho. Muito obrigada!

À minha amada madrinha, Tia Flávia, pelos bons conselhos, pelo apoio, pelo carinho e pelas boas risadas nas trilhas da Chapada!rs.

## RESUMO

Ocratoxinas são metabólitos secretados pelas espécies de fungos conhecidos por *Aspergillus* e *Penicillium*. Elas são os derivados fenilalanil de uma isocumarina substituída, sendo a ocratoxina A (OTA) a mais tóxica dentre os dois tipos de ocratoxina existentes, A e B. Sua semelhança com o aminoácido fenilalanina consiste na origem de sua toxicidade, a qual provoca um efeito inibitório em diversas enzimas cujo substrato é a fenilalanina. A regulamentação dos níveis toleráveis de ocratoxina nos alimentos para consumo humano e nas rações para consumo animal foi definida em alguns países. A União Européia, por exemplo, limitou os níveis máximos de ocratoxina em alguns alimentos, como o vinho (2ppb), o café (5ppb) e os cereais (5ppb). A fim de satisfazer esses limites de detecção, métodos analíticos mais simples, seguros e rápidos estão sendo desenvolvidos visando tornar acessível a utilização por pessoas não especializadas. Nesse contexto, a nanotecnologia tem muito a contribuir, especialmente, o ramo da nanotecnologia que utiliza as propriedades ópticas dos materiais. Os nanomateriais constituídos de metais nobres apresentam uma propriedade capaz de traduzir eventos de interação entre moléculas em um sinal mensurável, a Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada (LSPR). Além disso, a possibilidade de somar seletividade à sensibilidade levou à conjugação entre nanopartículas e macromoléculas biológicas capazes de reconhecer antígenos específicos. No presente estudo, utilizaram-se nanopartículas de ouro (AuNP) sintetizadas com citrato trissódico para avaliar o potencial de detecção de OTA. As nanopartículas foram caracterizadas pelas técnicas de espectrofotometria no uv-visível, espectrometria no infravermelho (FT-MIR), espectroscopia Raman, potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão. Anticorpos Anti-Ocratoxina A foram adsorvidos às nanopartículas coloidais. Os ensaios de detecção ocorreram em meio aquoso e o limite de detecção alcançou  $1.10^{-7}$   $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de OTA. Houve decréscimo da absorbância máxima com o acréscimo de OTA em concentrações crescentes com uma correlação de 0,98065. Concluiu-se que as AuNP permaneceram estabilizadas por carboxilatos após a adsorção dos anticorpos e estes permanecem ativos após a adsorção, sugerindo uma segunda esfera coordenação. O pH 9 se mostrou importante para a manutenção da atividade dos anticorpos.

Palavras-chave: Ocratoxina A. OTA. Nanopartículas. Nanobiossensores. Anticorpos. Nanotecnologia. Ouro. LSPR.

## ABSTRACT

Ochratoxins metabolites are secreted by the fungal species known as *Aspergillus* and *Penicillium*. They are derived from a substituted phenylalanine isocoumarin, and ochratoxin A (OTA) the most toxic among the two types of ochratoxin, A and B. Their similarity with the amino acid phenylalanine is the origin of their toxicity, which causes an effect inhibitory in various enzymes whose substrate is phenylalanine. The regulation of tolerable levels of ochratoxin in foods for human consumption and feed for animal consumption was defined in some countries. The European Union, for example, limited the maximum levels of ochratoxin in some foods, such as wine (2 ppb), coffee (5ppb) and cereals (5ppb). In order to meet these limits of detection, simpler analytical methods, safe and fast are being developed to make it accessible to use by unskilled people. In this context, nanotechnology has much to contribute, especially the branch of nanotechnology that uses the optical properties of materials. Those consisting of noble metal nanomaterials have a property capable of translating events of interaction between molecules in a measurable signal, the plasmon resonance surface located (LSPR). Furthermore, the possibility of adding selectivity sensitivity led to the conjugation of biological macromolecules and nanoparticles capable of recognizing specific antigens. In the present study, we used gold nanoparticles (AUNP) synthesized with trisodium citrate to evaluate the OTA detection potential. The nanoparticles were characterized by spectrophotometry in the UV-visible, infrared spectroscopy (FT-MIR), Raman spectroscopy, zeta potential and transmission electron microscopy. Anti-Ochratoxin A antibodies were adsorbed to colloidal nanoparticles. Detection assays occurred in an aqueous medium and the detection limit reached  $1.10^{-7}$  OTA  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . There was a decrease of the maximum absorbance to the OTA increase in increasing concentrations with a correlation of 0.98065. It was concluded that AUNP remained stabilized carboxylates after adsorption of antibodies and these remain active after adsorption, suggesting a second sphere coordination. The pH 9 proved important for maintaining antibody activity.

Tags: Ochratoxin A. OTA. Nanoparticles . Nanobiosensors . Antibodies. Nanotechnology . Gold. LSPR .

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>As Micotoxinas e a Ocratoxina A.....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Métodos de Detecção de Micotoxinas.....	15
<b>2.2</b>	<b>Nanotecnologia.....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Métodos de Produção de Nanopartículas.....	19
2.2.2	Método de Redução por Citrato.....	24
2.2.3	Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada .....	26
2.2.4	As Nanopartículas de Ouro .....	29
2.2.5	Nanobiossensores.....	30
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos Gerais.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Síntese de Nanopartículas.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização das Nanopartículas de Ouro.....</b>	<b>35</b>
4.2.1	Caracterização de AuNP pela Espectrofotometria no Uv-Visível.....	35
4.2.2	Caracterização de AuNP através da Microscopia Eletrônica de Transmissão..	36
4.2.3	Caracterização de AuNP através do Potencial Zeta.....	36
4.2.4	Caracterização de AuNP pela Espectrometria no Infravermelho.....	36
4.2.5	Caracterização de AuNP pela Espectroscopia Raman.....	37
<b>4.3</b>	<b>Conjugação de Nanopartículas de Ouro Coloidais com Anticorpos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Detecção de Ocratoxina A em Sistema Controlado.....</b>	<b>38</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização das Nanopartículas de Ouro.....</b>	<b>42</b>
5.1.1	Caracterização de AuNP pela Espectrofotometria no Uv-Visível.....	42
5.1.2	Caracterização de AuNP através da Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	46
5.1.3	Caracterização de AuNP através do Potencial Zeta.....	49
5.1.4	Caracterização de AuNP pela Espectrometria no Infravermelho.....	52



5.1.5	Caracterização de AuNP pela Espectroscopia Raman.....	56
<b>5.2</b>	<b>Interação da Nanopartículas de Ouro com Anticorpos.....</b>	<b>58</b>
<b>5.3</b>	<b>Detecção de Ocratoxina A.....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>

## 1. Introdução

A Ocratoxina A, doravante OTA, é um metabólito secretado pelas espécies de fungos conhecidas por *Aspergillus* e *Penicillium*, as quais representam um importante grupo de mais de 400 micotoxinas distintas quimicamente e toxicologicamente. O fungo produtor da ocratoxina A coloniza, principalmente, os grãos, tais como o café, as castanhas e o arroz; as frutas desidratadas e as pimentas. Uma vez presente, a OTA permanece nos alimentos mesmo após o processo industrial de produtos secundários, estando presente nos cereais matinais, no vinho, nos pães e ainda na carne e no leite de animais alimentados com rações contaminadas. A OTA apresenta uma meia vida de 35 dias no corpo humano e é conhecida por efeitos nefrotóxicos, imunotóxicos, teratogênicos e, mais recentemente, carcinogênicos e neurotóxicos (IARC; MARIN, S, WU, F. 2014).

Infelizmente, as autoridades reguladoras atentaram para esse problema apenas por volta da década de 1960, resultando em um grande atraso no desenvolvimento de medidas preventivas e corretivas (MARIN, S, WU, F. 2014). Atualmente, o tema tem atraído grande atenção científica pelo fato de a toxina ter sido considerada um disruptor endócrino, acarretando disfunções no sistema reprodutor do homem e da mulher. Esses efeitos alarmantes são devidos à sua peculiar estrutura química, a qual consiste em um derivado fenilalanil de uma dihidroisocumarina substituída, que parece competir com a fenilalanina natural, importantíssima para a síntese de proteínas envolvendo a enzima fenilalanina-tRNA sintetase. Ademais, a OTA tem mostrado afetar a inibição de ativação de enzimas na síntese de proteínas, suprimir a resposta imune e interferir na modulação de citocinas (WU, F. 2014, TOBEL, J.S., 2014, HÁ, T., 2015).

A regulamentação dos níveis toleráveis de ocratoxina nos alimentos para consumo humano e nas rações para consumo animal foi definida em alguns países. A União Européia, por exemplo, limitou os níveis máximos de ocratoxina em alguns alimentos, como o vinho (2ppb), o café (5ppb) e os cereais (5ppb) (European Commission, 2012). A fim de satisfazer esses limites de detecção, em uma variedade de alimentos distintos do ponto de vista químico e estrutural, métodos de detecção convencionais, tais como ELISA, cromatografia em camada delgada e HPLC são atualmente utilizados. Simultaneamente, métodos de detecção mais simples e portáteis foram impulsionados, através do uso de anticorpos, aptâmeros e nanomateriais inovadores (OSTRY, V., 2015).

Outras questões contribuem para a condição alarmante do tema, tais como, a resistência ao calor e ao tratamento químico; a diversidade de características físico-químicas apresentadas pelas micotoxinas, o que dificulta sobremaneira o desenvolvimento de uma técnica padrão-ouro que possa abranger todas; a não correlação entre visualização do fungo e contaminação por OTA, o que significa que grãos sem fungos aparentes podem estar contaminados; e, por último, mas não menos importante, a alta toxicidade demonstrada em concentrações demasiadamente pequenas, exigindo técnicas analíticas muito acuradas e robustas (TURNER, N.W., 2009).

Dessa forma, a necessidade de uma detecção simples, sensível, rápida, dispensando pessoal especializado, portátil e que não utilize produtos tóxicos torna-se evidente, haja vista a importância do monitoramento disseminado e acessível para toda a população, especialmente, para alguns segmentos, como pequenos agricultores, laboratórios de análises, entre outros, proporcionando o desenvolvimento de medidas efetivas na prevenção, correção e no controle da toxina e do fungo, bem como para o estudo epidemiológico, a fim de permitir segurança alimentar e evitar prejuízos irreparáveis para um estado e um país tão relacionados ao agronegócio.

Muitas são as alternativas disponíveis na área tecnológica visando o desenvolvimento de metodologias analíticas, no entanto, os dispositivos nanotecnológicos empregados no sensoriamento tem atraído muita atenção nas últimas duas décadas. A cada dia novas potencialidades são desenvolvidas, e dentre diversos materiais e aplicações, o propósito analítico e o diagnóstico por imagem estão entre os principais focos de estudo em andamento da área. Como é o caso do ramo da nanotecnologia que utiliza as propriedades ópticas de materiais em escala nanométrica para traduzir efeitos de interação entre moléculas em um sinal mensurável, dispensando o uso de marcadores fluorescentes ou colorimétricos e apresentando sensibilidades superiores. Os nanomateriais constituídos de metais nobres são os mais empregados. Tais metodologias baseiam-se na alta sensibilidade às perturbações externas que a nanopartículas apresentam, a qual se torna possível em virtude de uma propriedade óptica ímpar: a Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada (LSPR) (YAN, J. 2016; SEPULVIDA, B. 2009; SIN, M.LY., 2014)

Na Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada, o campo elétrico da luz interage com os elétrons da banda de condução da nanopartícula resultando em uma oscilação coerente e localizada dos chamados *plasmons* de superfície. O intenso campo eletromagnético induzido pela LSPR faz das nanopartículas transdutores de sinais muito eficientes, nos quais,

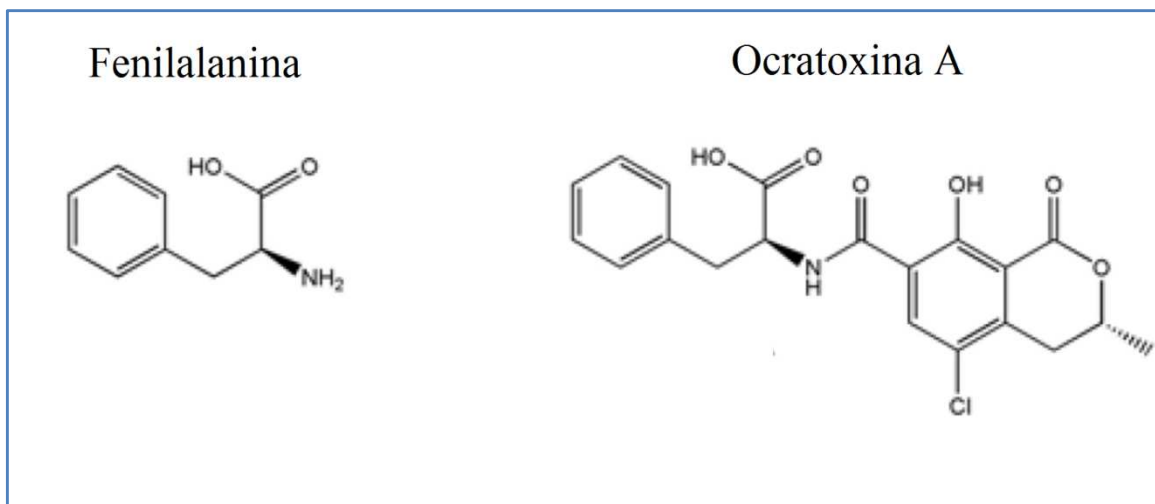
discretas mudanças no índice de refração local podem ser detectadas através de alterações nos perfis dos espectros de extinção (somatório entre a absorção e o espalhamento) da luz (QUINTEN, M., 2010). Para muitas moléculas orgânicas de alto índice de refração, a ligação às nanopartículas resulta no deslocamento do espectro para a direita (PETRYAYEVA, L. *et al.*, 2011). Além disso, o aumento do campo elétrico na superfície é capaz de proporcionar absorções e espalhamentos da luz com coeficientes de ordens de magnitude muito acima da absorção conferida pelos corantes mais eficientes, e, pode, inclusive, aumentar a fluorescência do próprio material, do qual, a nanoestrutura é constituída. Assim, a aplicação de nanopartículas em dispositivos de detecção e sensoriamento se tornou de grande interesse, da mesma forma, o emprego no diagnóstico por imagem (PRASAD, P., 2004, YAN, J. *et al.*, 2016). Nesse trabalho, foi avaliada a potencialidade de um sistema inovador e de fácil execução baseado em nanopartículas de ouro e anticorpos em meio aquoso, a fim de detectar pequenas concentrações de Ocratoxina A. Investigou-se aqui, possíveis interferências, efeitos e a aplicabilidade do princípio no desenvolvimento futuro de um dispositivo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. As Micotoxinas e a Ocratoxina A

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos. Os principais gêneros conhecidos são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Claviceps*. O fungo *Aspergillus* produz as aflatoxinas e as ocratoxinas; o *Penicillium* também produz as ocratoxinas; o *Fusarium* é responsável pelos tricotecenos, pela zearalenona e pela fumosina; por fim, o *Claviceps* produz os alcalóides do Ergot (MARIN *et al.*, 2013). Esses fungos estão naturalmente presentes em diversas *commodities* agrícolas em diversas regiões ao redor do mundo (FAO, 2013).

As ocratoxinas são derivados fenilalanil de uma isocumarina substituída, sendo a ocratoxina A (OTA) a mais tóxica dentre os dois tipos de ocratoxina existentes, A e B. Sua semelhança com o aminoácido fenilalanina consiste na origem de sua toxicidade, a qual, provoca um efeito inibitório em diversas enzimas cujo substrato é a fenilalanina (Figura 1). Uma consequência particularmente importante é a inibição da síntese protéica, contudo, não se limita a isso, apresentando, também, toxicidade mitocondrial e, conseqüentemente, estresse oxidativo celular, dano mitocondrial, peroxidação de lipídeos, interferência na fosforilação oxidativa, podendo, por fim, levar à morte celular em diversos tecidos. Um estudo realizado por Tobel *et al.* (2014) mostrou que a administração aguda de ocratoxina foi responsável por provocar desmielinização neuronal e redução na expressão de proteínas envolvidas com o processo de inflamação de células neuronais. A exposição crônica, por sua vez, mostrou estar relacionada ao aparecimento de resposta neuroinflamatória global e de processos de neurodegeneração. Ademais, em um estudo de O'Brien e Dietrich (2005) a ingestão de ocratoxina em altas concentrações mostrou-se nefrotóxica, hepatotóxica e tumorigênica



**Figura 1.** Molécula da Fenilalanina e da Ocratoxina A. Adaptado de Khoury, E.A., 2010.

O consumo de micotoxinas por animais por meio de ração contaminada também é um fator importante, uma vez que é responsável pela redução de ganho de peso pelo animal, diminuição de apetite, prejuízo da capacidade reprodutiva e aumento da susceptibilidade a doenças. É importante ressaltar que as micotoxinas podem e costumam ocorrer concomitantemente em diversos alimentos fazendo com que os efeitos sobre a saúde humana sejam sobrepostos (BINDER, E.M. *et al*, 2007). Dessa forma, é possível perceber que o acúmulo de micotoxinas em alimentos e rações representa grande ameaça à saúde humana e animal, além de perdas econômicas importante associadas tanto com o seu impacto na saúde humana, quanto na saúde animal e no agronegócio.

Muitos alimentos cultivados podem conter micotoxinas, principalmente as ocratoxinas e aflatoxinas, entretanto, os principais alimentos nos quais essas toxinas são encontradas são os cereais, o café, o vinho, o leite (proveniente de animais alimentados com ração contaminada) e as frutas secas. Estimou-se o consumo de ocratoxina por produto nos principais alimentos contaminados, sendo 0,94  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para os cereais, 0,19  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para os produtos dos cereais, 0,32  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para o vinho, 0,86  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para o café, 2,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para frutas secas e 0,44  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para o suco de uva. Observa-se que o consumo diário de ocratoxina dependerá do tipo de dieta de uma determinada região e por estar presente em uma vasta gama de alimentos, o consumo pode atingir níveis maiores do que estes apresentados pela OMS (2002). Estima-se também que uma pessoa de 60 kg tenha um consumo semanal aproximado de 45 ng/kg de Ocratoxina A e que o café isoladamente contribui com cerca de 3 ng/kg, considerando uma dieta típica europeia, cujo consumo de café é menor do que a

observado no Brasil.(56º relatório do comitê especializado da Organização Mundial de Saúde - WHO/OMS-Genebra/2002).

A Ocratoxina A é formada nos grãos verdes no período pós-colheita e não há influência das práticas agrícolas sobre a concentração da toxina nos grãos secos. Baixas concentrações dessa toxina foram associadas a boas práticas de fabricação, tais como, secagem rápida e efetiva dos grãos verdes, estocagem adequada e classificação para rejeição de grãos mofados ou danificados (WHO, 2002).

Muitos países optaram por regulamentar os limites aceitáveis de exposição às micotoxinas, uma vez que, em 2013, o relatório anual do Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASf) da União Europeia mostrou um aumento significativo das notificações de ocratoxina A em relação aos valores de 2012. Em 2013, foram identificadas 54 notificações de presença inaceitável de ocratoxina A e em 2012, 32 notificações, sendo que, em 2012, as micotoxinas ocuparam o primeiro lugar dentre as notificações de rejeição produtos em fronteiras na União Europeia. Em 2013, esteve entre as três principais causas de notificação, totalizando 410 notificações

A ocorrência de micotoxinas no café, principalmente da Acratoxina A no café verde, foi observada em todos os poucos estudos realizados no Brasil, dentre eles, um estudo realizado na cidade de São Paulo em 2007 (ALMEIDA *et al.*) demonstrou que 98,8% das amostras de café analisadas apresentavam contaminação por ocratoxina A (OTA) com concentrações variando entre 0,17 a 6,29 µg/kg, sendo que a concentração de OTA aceitável sugerida pela União Europeia no ano de 2000 foi de 5 ug/Kg no café verde. (UEKANE, T.M. *et al.*, 2010). Conforme o boletim da Agência de Segurança de Alimentos Europeia (ESFA-European Food Safety Authority), em 2007, 34.326 amostras de alimentos advindos de diversos países foram analisadas na União Europeia e o Brasil mostrou o maior índice de contaminação por micotoxinas, principalmente aflatoxina e ocratoxina, nas sementes e nas pimentas analisadas

Dessa forma, é possível perceber quão importante pode ser a mensuração e a identificação da presença de micotoxinas nos alimentos de maneira acessível para pequenos agricultores e laboratórios, haja vista a toxicidade relatada e a importância dos alimentos afetados, os quais são amplamente consumidos e muito importantes economicamente. A facilidade na detecção possibilitará a identificação de focos de contaminação, bem como a tomada de medidas preventivas e de contenção, evitando prejuízos irreparáveis à saúde da população, e à manutenção e crescimento do comércio de todos esses produtos agrícolas, cada

vez mais submetidos à credibilidade doméstica e internacional. Além disso, a detecção de fácil acesso e a execução factível para pessoas não especializadas, ausente no país atualmente, traria à luz novos casos, novos focos e estudos, contribuindo ainda mais para o melhoramento das alternativas, tanto para detecção quanto para eliminação.

Um fato importante que consiste em um ponto crítico do desenvolvimento de metodologias analíticas para esse fim recai sobre o limite de detecção. Isso se deve fato de a maioria das micotoxinas ser tóxica em quantidades demasiadamente pequenas, requerendo alta sensibilidade e confiança da metodologia empregada na sua mensuração, além disso, a diversidade estrutural das micotoxinas requer estratégias muito específicas para sua detecção e quantificação confiável.

### **2.1.1. Métodos de detecção de Micotoxinas**

Atualmente, a análise de micotoxinas em alimentos é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas. Consiste em uma técnica muito sensível e segura quando manuseada por pessoal especificamente treinado e quando as amostras foram submetidas ao pré-tratamento adequado em relação à sua estrutura química e características físico-químicas. Entretanto, pode ser considerada uma metodologia analítica onerosa, cujo manuseamento por pessoas não especializadas não é possível.

Turner et. al, 2008, descreveu processos de pré-tratamento das amostras que antecedem a quantificação, como a Extração Líquido-Líquido que utiliza a diferença de polaridade para separar a substância de interesse em uma mistura de líquidos imiscíveis. Nesse caso, as limitações recaem sobre o longo período de tempo necessário para a extração e sobre a possibilidade de perda de analito por adsorção ou por incompatibilidade com a matriz. Há também a extração por fluido supercrítico que utiliza um fluido, CO<sub>2</sub>, para extrair o componente desejável da matriz, esse método foi relatado como de alto custo tanto pelo equipamento quanto pelo manuseador especializado.

Dentre os métodos de separação, a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são as mais importantes. Essas técnicas estão normalmente associadas à espectrometria de massas para quantificação acurada. Na CCD a principal desvantagem está na laboriosa e personalizada preparação da amostra. Outra possibilidade é a eletroforeses capilar (EC) associada a um processo de detecção por fluorescência que compartilha das mesmas limitações da CCD ((TURNER *et. al*, 2008)..



Uma técnica de detecção muito abrangente e muito bem estabelecida, conhecida por ELISA, também pode ser utilizada atualmente. Ela consiste em um ensaio imunoenzimático capaz de detectar e quantificar um analito (antígeno) em concentrações relativamente baixas através da utilização de anticorpos primários, secundários, marcadores e enzimas. As etapas de adição dos anticorpos são seguidas por diversas lavagens e para revelação do teste adiciona-se um substrato, que ao reagir com a enzima produz cor. Entretanto, as múltiplas lavagens e a execução laboriosa exigem pessoas qualificadas para realizar os ensaios. Além disso, o alto custo proveniente do grande consumo de anticorpos faz desta técnica um teste pouco viável para o uso frequente da população (TURNER *et. al*, 2008). Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia de rápida detecção, alta sensibilidade e que seja capaz de ser realizada por pessoas não especializadas.

Recentemente, nanossensores que identificam mudanças na massa, carga ou propriedades ópticas de um analito submetido ao acoplamento com anticorpos aderidos em superfície tem demonstrado resultados muito promissores (SERTOVA, N.M., 2015). Contudo, como afirma Hayat (2013), por estarem em fase de desenvolvimento, pelo número limitado de sensores disponíveis e pelo pouco conhecimento sobre estratégias de acoplamento e imobilização de substâncias específicas, os desafios para essas técnicas ainda são grandes.

## **2.2. Nanotecnologia**

Há inúmeras definições para o termo “Nanotecnologia” ao redor do mundo e não é difícil perceber tal diversidade nos artigos e livros disponíveis. Em uma matéria da revista *Nature Nanotechnology* (THEIS, T., 2006) foi solicitado aos pesquisadores e aos representantes de grandes indústrias nanotecnológicas de diversos países, a definição da palavra “Nanotecnologia”. Os entrevistados expuseram uma variedade de perspectivas sobre o termo, algumas entusiasmadas, como, “*um fenômeno tecnológico, econômico e social potencialmente capaz de revolucionar a maneira de se viver.*”; enquanto outras, evidentemente céticas, tal qual, “*uma caixa de ferramentas que fornece unidades nanométricas para a adaptação de novos materiais, dispositivos e sistemas.*”. No entanto, apesar dessa diversidade de opiniões, todas as definições transitam entre os conceitos de escala nanométrica, de propriedades peculiares e, por fim, citam as finalidades. Baseando-se nisso, a nanotecnologia pode ser ajuizadamente definida como o estudo, o desenvolvimento ou o uso de nanomateriais para finalidades acadêmicas, analíticas, biomédicas ou energéticas, entendendo por nanomateriais, as estruturas cujo tamanho está entre 1 e 100 nm e cujas

características são distintas daquelas observadas pelo mesmo material quando este se encontra em escala macrométrica (EUSTIS,S., 2006). Todavia, não é raro observar o termo “nano” para estruturas medindo poucas centenas de nanômetros. Um nanômetro, por sua vez, é definido como um bilionésimo de metro ou  $10^{-9}$  metro, e corresponde, por exemplo, a 6 átomos de carbono alinhados ou a 10 átomos de hidrogênio, ou seja, trata-se de uma escala de dimensões moleculares (EDWARDS, S, 2008; THEIS,T., 2006)

Os relatos sobre o uso de nanomateriais datam desde a Roma Antiga, por volta de IV a.C., período no qual as dispersões de nanopartículas eram empregadas no artesanato e na decoração. Um objeto muito popular, e talvez o mais famoso, é o Cálice de *Lycurgus* (Figura 2), o qual pode ser visto no Museu Britânico em Londres. Ele é composto por nanopartículas de ouro e prata de aproximadamente 70 nm em uma matriz de vidro, e, devido a isso, apresenta-se de duas cores: amarelo-esverdeada ou vermelha, dependendo da posição da fonte de luz, se externa ou internamente localizada em relação ao cálice. Há também relatos na Idade Média, época na qual as nanopartículas de ouro, prata e cobre eram utilizadas na fabricação dos vidros que compunham os vitrais das igrejas, no entanto, pouco se sabia a respeito. O estudo sobre as sínteses e as propriedades desses materiais teve seu início apenas no século XIX, quando o cientista inglês Michael Faraday sintetizou nanopartículas de ouro utilizando fósforo como agente redutor e dissulfeto de carbono como estabilizante, sendo, inclusive, o primeiro a sugerir que a variação no tamanho das partículas tivesse influência sobre a coloração delas (FARADAY, M., 1857). Todavia, apesar de ter seu uso relatado de tempos longínquos e de sua síntese ter sido realizada e inicialmente elucidada, considera-se que a aplicação tecnológica das nanopartículas só pode ser desenvolvida no século seguinte, durante as décadas de 1920 e 1930, nos Laboratórios de Elétrica Geral do físico-químico norte-americano Ivin Lagmuir (EDWARDS, S., *et al.* 2008; SANDHU, A. *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Cálice de *Lycurgus* (TOMA, H.. 2009)

A partir da década de 1950, a nanotecnologia ganhou maior espaço na ciência, devido, principalmente, ao advento das técnicas de microscopia de alta resolução. Na mesma década, realizou-se o primeiro estudo que racionalizou a síntese aquosa de nanopartículas de ouro, produzidas através da redução do ácido tetracloroáurico pelo citrato de sódio. Esse estudo foi conduzido pelos cientistas John Turkevich, Peter Cooper Stevenson e James Hillier, sendo amplamente utilizado até os dias atuais. O tema também esteve no discurso do físico norte-americano Richard Feynman, durante o Encontro da Sociedade Americana de Física, em 1959, considerado o marco fundador da área. Em sua palestra, intitulada "Há muito espaço na parte inferior", ele especulou que, no futuro, seria possível manipular diretamente os átomos (FEYNMAN, R.P., 1961). Por volta de 1960, a nanotecnologia passou a integrar um ramo da ciência conhecida por "Ciência de Superfícies", entretanto, a palavra, propriamente dita, foi cunhada apenas em 1974 pelo pesquisador japonês Norio Taniguchi, professor da Universidade de Ciências de Tokyo, que a usou para descrever processos de usinagem de silício em escalas menores do que um micrômetro. Em 1981, o jornal/revista *Proceedings of National Academy of Sciences* publicou o que é considerado o primeiro artigo de jornal a discutir especificamente o tema, com o título "*Molecular Engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation*", ou seja, "Engenharia Molecular: Uma abordagem para o desenvolvimento das capacidades gerais para manipulação molecular", de autoria do engenheiro estadunidense K. Eric Drexler (EDWARDS, S., *et al.* 2008; SANDHU, A. *et al.*, 2006; THEIS, T., *et al.*, 2006).

Atualmente, a nanotecnologia está em todas as áreas do conhecimento e tem permitido avanços na geração de energia, na segurança de produtos farmacêuticos, nos exames de diagnóstico por imagem, no tratamento de água, bem como, nas metodologias analíticas, apresentando um caráter multidisciplinar intrínseco, no qual, a química, a física, a engenharia, a matemática e a biologia tornaram-se indissociáveis. A escala nanométrica, a biocompatibilidade e a biofuncionalidade, fizeram com que alguns nanomateriais despertassem grande interesse biomédico e biológico. Ao demonstrarem a habilidade de incorporação aos sistemas biológicos e conjugação com biomoléculas ou ligantes sintéticos, surgiram novas aplicações, como, por exemplo, a de agir como sistema de liberação de drogas ou como marcadores bioquímicos. Além disso, certos nanomateriais apresentam a capacidade de aumentar a sensibilidade dos ensaios, ao amplificar o sinal gerado, por isso, tornaram-se alvo de muito interesse para a construção de sensores, como é o caso das nanopartículas metálicas. Tais dispositivos compartilham do privilégio de oferecer uma rápida e seletiva forma de traduzir eventos de interação entre moléculas em um sinal mensurável. Por conseguinte, diversas formas de detecção se tornaram possíveis, tais como, a detecção eletroquímica e as baseadas nas propriedades ópticas das nanopartículas (HAYAT, A.Y. *et al.* 2013).

### **2.2.1. Métodos de Produção de Nanopartículas.**

Nanopartículas ou *clusters* consistem em um tipo específico de nanomateriais e são definidos em virtude do número de átomos pelos quais são compostos, estes devem estar no intervalo entre 3 e  $10^7$  átomos (MOORES, A. & GOETTMANN, F. , 2006). Atualmente, existem diversas técnicas para produção de nanopartículas e como não há uma técnica ideal para qualquer finalidade, elas devem ser analisadas e avaliadas para que suas características sejam compatíveis com os objetivos propostos. Com o intuito de familiarizar o leitor com as alternativas de síntese existentes, está brevemente descrito neste tópico os princípios básicos das técnicas para produção de nanopartículas metálicas mais conhecidas atualmente.

Existem, basicamente, duas metodologias gerais para fabricação de nanoestruturas. Elas são conhecidas como *Top down (de cima para baixo)* e *Bottom up (de baixo para cima)*. Como o próprio nome sugere, a metodologia *top down* produz estruturas nanométricas a partir de materiais macrométricos. A fotolitografia e a litografia por feixe de elétrons consistem em

duas técnicas do tipo *top down* muito bem estabelecidas. De maneira inversa, o método *bottom up* baseia-se na construção de estruturas nanométricas a partir de unidades básicas, como átomos ou moléculas, através da indução de um auto-arranjo entre elas ou da redução dos íons que irão compor o material. Sínteses químicas baseadas em reações de oxirredução de compostos orgânicos e inorgânicos são as principais representantes das estratégias do tipo *bottom up* (HEO, K.C., *et al.*, 2015; PIMPIN, A., *et al.* 2011; SHENHAR, R. *et al.*, 2003)

A fotolitografia é muito conhecida pelo seu importante papel na construção de microprocessadores, circuitos e semicondutores, tendo sido a principal ferramenta da nanotecnologia industrial no período de 1985 a 2005 (STELICK, S.J, *et al.*, 2005). Basicamente, essa técnica baseia-se na determinação de padrões sobre um material semicondutor, que são definidos utilizando a luz. O processo consiste na aplicação de um produto químico especial fotossensível sobre a superfície que se quer trabalhar. Em seguida, utiliza-se uma “máscara” com furos nanométricos através dos quais a energia incidida poderá passar livremente, e, sobre a “máscara”, aplica-se uma luz ultravioleta. Ao incidir a luz sobre o material, o produto sensível à luz sofre alterações, enrijecendo ou dissolvendo-se, de forma que a interação entre o material e a luz poderá facilitar ou dificultar a lavagem e retirada da película fotossensível, permitindo assim, a criação de um molde sobre o substrato, normalmente um metal. A partir daí, a superfície do substrato é corroída por processos químicos ou físicos de acordo com o molde criado. Ao final do processo de corrosão, o molde é retirado, resultando no substrato modelado (MIJATOVIC, D., *et al.*, 2005; STELICK, S.J, *et al.*, 2005). A dificuldade de execução desta técnica aumenta quando as estruturas são menores do que 100 nm, uma vez que, nesses casos, é necessária a utilização dos Raios-X, que freqüentemente danificam a maior parte dos materiais utilizados como “máscaras” (MIJATOVIC, D. *et al.*, 2005 )

Outras duas técnicas litográficas da mesma metodologia (*top down*) apresentam finalidades semelhantes e possuem o mesmo princípio, entretanto, as formas de energia utilizadas são os elétrons e os íons, e, por isso, diferem em algumas propriedades. Uma dessas técnicas é a Litografia por Feixe de Elétrons, também conhecida pelo título no idioma inglês como *Electron-beam lithography* (EBL), na qual, um molde é criado sobre o substrato através de um feixe de elétrons focalizado sobre o material fotossensível. Já a Litografia por Feixe de Íons, conhecida na sua forma em inglês por *Focused ion-beam lithography* (FIB), utiliza um feixe de íons, freqüentemente íons do elemento Gálio (Ga), que são focalizados diretamente

sobre o substrato ou a película, corroendo-os, sendo ele o próprio processo de corrosão. Ambas as técnicas são capazes de criar estruturas menores do que 10 nm, mas possuem duas dificuldades importantes: o custo é mais elevado do que a fotolitografia e os processos são mais lentos (MIJATOVIC, D. *et al.*, 2005 ).

Sabe-se que o princípio básico da litografia foi desenvolvido pelo dramaturgo Alois Senefelder de Munique, por volta de 1798. Na época, a técnica baseava-se na gravação e replicação de desenhos sobre uma base de pedra utilizando moldes e produtos químicos. Desde então, as litografias, de maneira geral, permitiram replicar um padrão predeterminado sobre um substrato (WALLRAFF, G. M., *et al.*, 1999). Todavia, nem todas as técnicas litográficas se enquadram na metodologia *top down*. A litografia de nanoesferas tradicional é um exemplo de estratégia do tipo *bottom up*. Nela, utiliza-se um molde composto por esferas de poliestireno, sobre o qual é depositado um metal. O metal, então, produz uma monocamada de nanopartículas triangulares, as quais foram formadas nos espaços vazios entre as esferas justapostas. Esses nanotriângulos são recolhidos através da adição de solventes que dissolvem e retiram o molde de poliestireno (EUSTIS, S., *et al.* 2006; HAYNES, C.L. *et al.*, 2001). Atualmente, nanopartículas de outros formatos também podem ser produzidas por esta técnica, utilizando-se de novas estratégias, como, por exemplo, um molde de dupla camada de nanoesferas de poliestireno ou através de deposições seqüenciais em diferentes ângulos (CHEN, K. *et al.*, 2015).

A metodologia conhecida por *bottom up*, empregada neste trabalho, reúne técnicas mais baratas e de maior aproveitamento de material entre as duas metodologias citadas, além disso, são capazes de formar nanopartículas muito pequenas. Em contrapartida, a dificuldade da maioria das técnicas *bottom up* recai sobre a habilidade de formar nanoestruturas monodispersas e homogêneas, ou seja, o controle do processo não é fácil, principalmente para estruturas mais complexas como peças elaboradas ou ainda circuitos integrados. Contudo, nanoestruturas complexas, cujo material constituinte tenha tido sua composição delineada a nível molecular, na forma de ligas metálicas (NUGROHO, F., *et al.*, 2016), por exemplo, são capazes de produzir dispositivos que não seriam possíveis caso fossem utilizadas apenas estratégias do tipo *top down*. Dessa forma, as duas estratégias podem desenvolver dispositivos mais elaborados e melhores se forem usadas complementarmente (LU, W., *et al.*, 2007; MIJATOVIC, D. *et al.*, 2005; NUGROHO, F., *et al.*, 2016).

As técnicas *bottom up* podem partir de abordagens mais elaboradas, como a automontagem ou de mecanismos mais simples, como a supersaturação de soluções para formação de cristais. As nanoestruturas automontadas, conhecidas pelo nome de *Self-Assembled*, do inglês, baseiam-se na organização autônoma de unidades supramoleculares ou de nanopartículas para formar nanoestruturas e de moléculas, a fim de formar monocamadas ultrafinas. Ela ocorre através de reações químicas ou quando moléculas orgânicas entram em contato com superfícies metálicas. O termo Auto-organização ou Automontagem indica, de maneira genérica, uma organização autônoma de padrões ou estruturas a partir de componentes em qualquer escala. Na nanotecnologia, especificamente, as características moleculares e supramoleculares, tais como, a forma, a carga, a polarizabilidade e as formas de interação (iônica, van der Waals, hidrofóbicas, ligações covalentes e de hidrogênio) devem ser conhecidas para que possam ser usadas em favor do desenvolvimento e controle dos processos. Atualmente, alguns nanomateriais sofisticados tem sido produzidos utilizando estratégias altamente direcionadas baseadas nesta abordagem (BUSSERON, E., *et al.*, 2013).

Os mecanismos mais simples, por sua vez, constituem a primeira etapa das estratégias de Automontagem e a principal forma de nanopartículas metálicas a partir de unidades moleculares ou atômicas. Afora a diversidade de possibilidades, a grande maioria baseia-se em reações químicas de decomposição ou redução de íons metálicos em átomos neutros. Elas ocorrem tanto em solventes orgânicos quanto em soluções aquosas, ou seja, em fase líquida, e consistem em técnicas regidas pelas propriedades termodinâmicas das reações e/ou pela cinética de crescimento, podendo ser manipuladas através do controle dos processos de cristalização, nucleação, crescimento e estabilização das partículas (BUSSERON, E., *et al.*, 2013). Entretanto, apesar dos avanços, o controle dos processos de síntese de nanopartículas em fase líquida encontra-se em estágios iniciais quando comparado às sínteses orgânicas de desenvolvimento de moléculas para drogas e fármacos atuais (XIA, Y., *et al.*, 2009).

Baseando-se nas propriedades termodinâmicas, há modelos preditivos capazes de determinar a forma típica termodinamicamente estável que as partículas cristalinas, ou seja, derivadas de sólidos cristalinos, assumirão durante uma síntese química. Um modelo de previsão utilizado atualmente é o chamado Modelo de Construção de Wulff e é empregado para prever formatos de equilíbrio para partículas condutoras e semicondutoras em diferentes sistemas reacionais (BARMON, G.D., *et al.*, 2015). Esse conceito de “*forma de equilíbrio*” foi introduzido pelo cientista americano Josiah Gibbs no final do século XIX, o

qual defendia que a matéria tende a adquirir uma forma capaz de minimizar a energia superficial total do sistema. Na mesma época, aproximadamente 1895, o mineralogista russo Georg Wulff lançou a tese de que a forma capaz de minimizar tal energia é aquela, na qual, a distância entre cada face e o centro é proporcional à energia de superfície da respectiva face. A partir daí, simulações que utilizam o modelo de Wulff, baseado em princípios da mecânica quântica para calcular as energias de superfície, puderam ser rotineiramente empregados para justificar eventos experimentais e para delinear novos materiais (BARMPARIS, G.D., *et al.*, 2015; BARMPARIS, G.D., *et al.*, 2011). Contudo, o modelo de Wulff não é capaz de abranger todas as realidades, possuindo, assim, certas limitações, tal como a dependência de uma condição de equilíbrio, que pode não ser alcançada durante as sínteses (XIA, Y., *et al.*, 2009).

Todavia, a consideração de fatores cinéticos consiste em uma abordagem distinta do processo de cristalização daquela considerada termodinâmica, a qual se refere aos modelos de Construção de Wulff e demais modelos baseados na energia de Gibbs. A cinética de crescimento é a abordagem mais empregada no desenvolvimento das nanoestruturas e aplica-se à formação de todas as estruturas cristalinas formadas em solução pelas técnicas *bottom up* que demandam decomposição ou redução dos precursores. Nessa abordagem, são três as etapas de formação dos cristais: a nucleação, a evolução dos núcleos em sementes e o crescimento das sementes para se tornarem cristais. A etapa de nucleação consiste na decomposição ou redução do componente precursor em átomos de valência zero (YOU, H., *et al.*, 2013; XIA, Y., *et al.*, 2009).

Nos processos de decomposição, o aquecimento ou a sonicação são os responsáveis pela decomposição do precursor em átomos. A concentração de átomos, então, aumenta, atingindo um ponto de supersaturação. Nesse ponto, dímeros e trímeros começam a se formar, dando origem a pequenos agregados, também chamados de pequenos *clusters* ou núcleos. Os núcleos crescem até o momento em que a concentração de átomos decresce e ultrapassa o nível mínimo de supersaturação necessário para indução da formação dos núcleos. A partir daí, não haverá formação de novos núcleos. Entretanto, com o fornecimento contínuo de átomos via decomposição, os núcleos poderão crescer lentamente até atingir um equilíbrio entre os átomos da superfície dos cristais e os átomos em solução (XIA, Y., *et al.*, 2009).

No processo de redução, um agente redutor é adicionado na reação para doar os elétrons e reduzir os átomos do precursor. Os precursores normalmente são sais metálicos



solubilizados em um solvente. No meio reacional, o composto precursor formará um complexo, ou seja, uma combinação de um átomo metálico central com várias ligantes, cujo estado de oxidação é alto. Tais complexos auxiliam e estabilizam a formação de dímeros e trímeros de átomos do elemento precursor, que são formados à medida que elétrons são introduzidos no complexo, e, constituem, por tanto, os primeiros núcleos. Em vista disso, alguns átomos do núcleo não devem estar necessariamente totalmente reduzidos, mas podem estar em estados de oxidação intermediários. Durante o crescimento do núcleo, os primeiros átomos a formá-lo acabam sendo completamente reduzidos, atingindo a valência zero, já os átomos mais externos, podem continuar oxidados, no entanto, já consistem em um pequeno *cluster*. Acredita-se que dímeros e trímeros tenham maior eletroafinidade em comparação ao precursor isolado. Por conseguinte, espera-se que a transferência de elétrons ocorra preferencialmente entre o agente redutor e os dímeros e trímeros do que entre o agente redutor e o precursor monomérico. Dessa forma, observa-se que o complexo no qual o precursor está adsorvido na solução é imprescindível para a formação e crescimento dos núcleos (POLTE, J. *et al.*, 2010; XIA, Y., *et al.*, 2009).

A oferta do precursor e a presença de ligantes consistem em duas maneiras de acelerar ou reduzir o crescimento de núcleos metálicos pré-formados. Fornecendo novos complexos de precursor e despreendendo os ligantes de um *cluster* é possível acelerar drasticamente o crescimento dos cristais metálicos. A escolha do agente redutor e o aumento temporal entre a nucleação e o crescimento também podem assegurar o controle do processo, como, por exemplo, na escolha de um redutor que preferencialmente reduza íons na presença de uma superfície metálica sob baixas temperaturas, o qual poderá evitar novas nucleações (BROWN, K.R., 2000). Após o processo de adição de novos átomos ao núcleo, que constitui a fase de crescimento, o nanocristal é formado. Ele consiste em uma estrutura preenchida internamente por átomos reduzidos e, superficialmente, por átomos metálicos positivamente carregados, coordenados a ligantes ou solvatados pelas moléculas do solvente. Vale ressaltar que muitos detalhes do processo de formação ainda são controversos, principalmente, os que dizem respeito ao processo inicial de formação dos núcleos, sobre os quais, não se sabe ao certo a ordem em que as interações acontecem, isto é, se precedem ou não a total redução dos átomos (WUITHSCHICK, M., *et al.*, 2015; POLTE, J. *et al.*, 2010; XIA, Y., *et al.*, 2009).

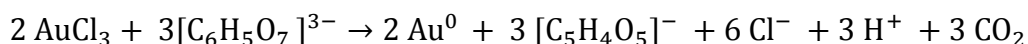
A técnica utilizada neste trabalho foi a de redução de ouro por citrato de sódio, ela apresenta uma execução simples, é muito bem estabelecida, vastamente empregada,

constituindo assim, a técnica mais utilizada e descrita para síntese de nanopartículas de ouro dentre todas as técnicas de síntese química disponíveis (WUITHSCHICK, M., *et al.*, 2015), e, está descrita a seguir.

### 2.2.2. Método de Redução por Citrato

Desenvolvido por Turkevich, em 1951, o método de síntese de nanopartículas através da redução pelo citrato consiste em uma técnica *bottom up*, na qual, uma solução aquosa de ácido tetracloroáurico tri-hidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) é empregada como precursor de íons metálicos e uma solução aquosa de citrato de sódio tribásico ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ) como agente redutor. A reação ocorre à temperatura de  $100^\circ\text{C}$  e agitação magnética. Conforme proposto por Turkevich, o mecanismo responsável pela formação das nanopartículas segue o mecanismo básico proposto pela abordagem cinética de crescimento descrita no tópico anterior, acrescentado das especificidades dos reagentes usados e consiste em uma das teorias ainda abordadas atualmente (TURKEVICH, J. *et al.*, 1951; WUITHSCHICK, M., *et al.*, 2015).

Dessa forma, propõem-se que o mecanismo consiste na formação de um complexo entre o citrato e os íons  $\text{Au}^+$  e  $\text{Au}^{3+}$  do ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), que, em solução, dissocia-se em  $\text{AuCl}_3$ ,  $\text{H}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . O complexo apresenta-se como uma molécula de caráter polimérico formada de sal metálico e moléculas de citrato, que ao serem oxidadas, convertem-se em moléculas de dicarboxil-cetona produzindo  $\text{H}^+$ ,  $\text{CO}_2$  e liberando 2 elétrons. Os dois elétrons cedidos são aceitos pelo átomo de ouro, o qual é reduzido a  $\text{AuCl}$  liberando  $2\text{Cl}^-$ . O complexo citrato/dicarboxilcetona-ouro envolve os íons metálicos, promovendo a colisão entre eles e reduzindo-os até a valência 0. Tais átomos começam a formar cadeias curtas que se transformam em núcleos e através da atividade complexante do citrato e da dicarboxil cetona, mais átomos são atraídos. A equação geral da síntese proposta por Turkevich é a seguinte:



A proposição de Turkevich não contém uma descrição detalhada da origem da formação do núcleo e, conforme citado anteriormente, a origem do núcleo consiste em um tema controverso, apresentando, por tanto, diferentes proposições (POLTE, J. *et al.*, 2010). Entretanto, Turkevich admite dois processos possíveis, o mecanismo de nucleação baseado na hipótese de que a nucleação possa ter seu início em pequenos pontos de nucleação, os quais podem ser as impurezas, a superfície rugosa do vidro ou até mesmo os esporos ou bactérias, e, o mecanismo da supersaturação de íons com íons de ouro, que coalescem formando os primeiros núcleos (TURKEVICH, J. *et al.*, 1951). A partir daí, seguem-se as etapas de formação de sementes e crescimento proposto pelo enfoque descrito no tópico anterior para as sínteses de maneira genérica. A variação da temperatura da reação exerce influência sobre o diâmetro das partículas e a homogeneidade, de tal forma que temperaturas elevadas estimulam a formação de nanopartículas menores e mais homogêneas, enquanto temperaturas mais baixas induzem o contrário. A concentração de citrato, por sua vez, exerce efeito inverso sobre o diâmetro médio das partículas, ou seja, concentrações mais altas produzem partículas menores, todavia, um estudo realizado por Ji, X. *et al.* (2007) identificou que há um limite para esse efeito e corresponde a razões molares citrato/ouro com valores a partir de 7, as quais resultam em agregação das nanopartículas.

Por fim, a formação das nanopartículas dá origem a uma dispersão coloidal, também chamada de sistema coloidal ou apenas colóide, que é definido como um sistema no qual uma substância está microscopicamente dispersa em outra. Sistemas coloidais são constituídos de uma fase interna, a fase dispersa, e uma fase contínua ou meio de dispersão. Quando a fase dispersa é sólida e a fase contínua é líquida, a dispersão coloidal é denominada “Sol” (HIEMENZ, P., *et al.*, 1986) e assim se classificam os colóides de nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de redução com o citrato.

As dispersões coloidais compostas por nanopartículas metálicas diferenciam-se completamente das demais em virtude de uma propriedade óptica que as nanopartículas metálicas apresentam, denominada de Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada. Essa propriedade da cor aos colóides formados e intensa absorção e espalhamento da luz na região visível do espectro eletromagnético, destinando-os a finalidades específicas desses tipos de sistemas. A seguir, está descrito o importante fenômeno de Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada.

### **2.2.3 Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada.**

A Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada (LSPR), ou plasmônica, é um fenômeno óptico gerado pela luz quando esta interage com nanopartículas condutoras. O campo elétrico da luz interage com os elétrons da banda de condução da partícula resultando em uma oscilação coerente e localizada dos chamados *plasmons* de superfície. Esse fenômeno é comum às nanopartículas metálicas e ocorre em virtude de uma propriedade que é a principal característica dos elementos metálicos, a de serem bons condutores elétricos (PETRYAYEVA, E., *et al.*, 2011).

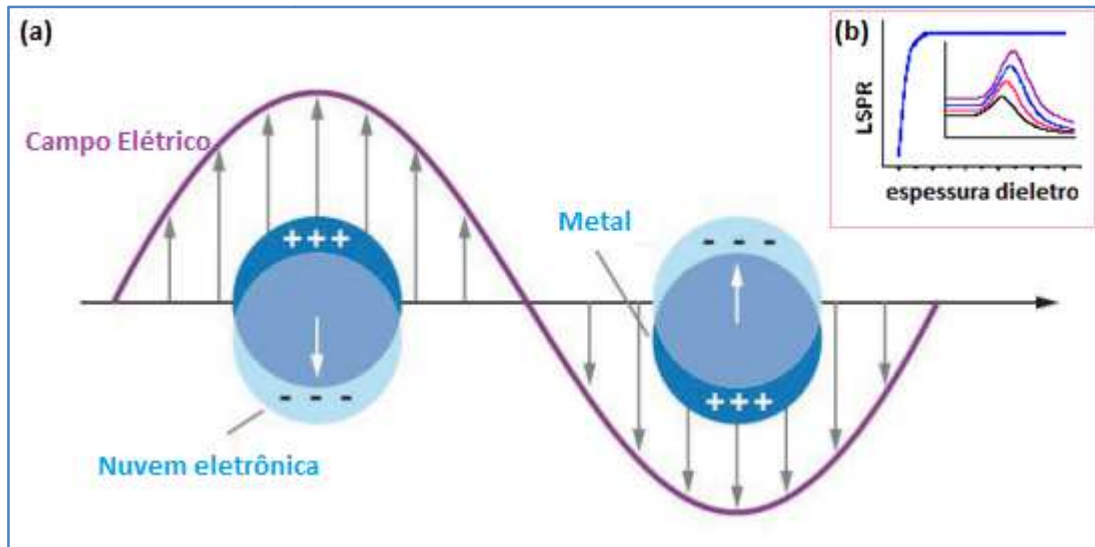
Quando os átomos estão isolados, seus níveis de energia são muito bem definidos. À medida que o número de átomos aumenta, formando uma estrutura cristalina sólida, os níveis de energia mais altos, pertencentes a cada um dos átomos agrupados, tornam-se contínuos, dando origem às chamadas bandas de energia. Isso ocorre devido à enorme proximidade entre os níveis energéticos quando o número de átomos atinge escalas maiores, como, por exemplo, a escala nanométrica. Por conseguinte, os elétrons da camada de valência deixam de pertencer aos átomos individuais e passam a ocupar as bandas de energia formadas. Formam-se, então, a banda de valência, preenchida com os elétrons provenientes dos níveis energéticos mais altos, e a banda de condução, energeticamente mais alta e parcialmente ocupada por elétrons ou completamente desocupada. Nos metais, os elétrons da banda de valência podem facilmente ocupar níveis energéticos mais altos, passando a ocupar a banda de condução. Os elétrons de condução estão aptos a percorrer livremente a extensão metálica da nanopartícula e produzir efeitos ópticos peculiares e importantes sob algumas condições específicas (WALKER, J., *et al.*, 2009).

Posto isso, quando uma onda plana incide sobre uma partícula de dimensões reduzidas, na qual, para fins de aproximação,  $R/\lambda < 0,1$  (onde  $R$  é o raio da nanopartícula e  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz incidente), o campo elétrico oscilante da onda eletromagnética incidente provoca uma oscilação ressonante, também chamada de coerente, dos elétrons de condução do metal (camada  $d$  para ouro e prata) (Figura 2.3.1.1). Por conseguinte, a polarização da densidade de carga criada induz o surgimento de forças restauradoras, que contribuirão para a oscilação dos elétrons frente ao núcleo (PETRYAYEVA, E., *et al.*, 2011; WILLETS, K.A., *et al.*, 2007). Esse fenômeno, conhecido como Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada, está bem caracterizado em nanopartículas superiores a 10 nm, porém, insatisfatoriamente entendido em dimensões inferiores, uma vez que a ressonância dos plasmons passa a ser fortemente influenciada pelo regime quântico assumido pelos elétrons de

condução das nanoesferas menores do que 10 nm. Nessas dimensões reduzidas, os níveis de energia da banda de condução deixam de ser contínuos e apenas determinadas transições eletrônicas e plasmônicas passam a ser permitidas, conseqüentemente, o sinal detectável da RPSL é fortemente enfraquecido. Além disso, há expressivo deslocamento da banda plasmônica para a esquerda, a região do ultra-violeta (SCHOLL, J. A., *et al.*, 2012)

O intenso campo eletromagnético induzido pela LSPR faz das nanopartículas transdutores de sinais muito eficientes, nos quais, discretas mudanças no índice de refração local podem ser detectadas através de alterações nos perfis dos espectros de extinção e espalhamento da luz, as quais acarretam na perturbação desse campo elétrico evanescente (KEMEM, O. *et al.*, 2012). Para muitas moléculas orgânicas de alto índice de refração, a ligação às nanopartículas resulta no deslocamento do espectro para a direita, devido à mudança de frequência da oscilação eletrônica (PETRYAYEVA, E., *et al.*, 2011). Além disso, o aumento do campo elétrico na superfície é capaz de proporcionar absorções e espalhamentos da luz com coeficientes de ordens de magnitude muito acima da absorção conferida pelos corantes mais eficientes, e, pode, inclusive, aumentar a fluorescência do próprio material, do qual, a nanoestrutura é constituída. Assim, a aplicação de nanopartículas em dispositivos de detecção e sensoriamento se tornou de grande interesse, da mesma forma, o emprego no diagnóstico por imagem (BRIGGER, I. *et al.*, 2012; PRASAD, P.N., *et al.*, 2004).

Estudos computacionais e experimentais têm mostrado que a forma, o tamanho e a estrutura cristalina das nanopartículas de ouro e prata consistem nos fatores mais importantes para a determinação do número, posição e intensidade dos modos de LSPR (XIA, Y. *et al.*, 2009). Apesar disso, outras características das dispersões de nanopartículas também influenciam os perfis de absorção e espalhamento da LSPR em menor grau, como é o caso da constante dielétrica do meio e da distância interpartículas. A constante dielétrica do meio circundante consiste em uma propriedade elétrica intrínseca dos materiais ou das interfaces. Pode-se dizer que o deslocamento de íons em um campo elétrico culmina na diminuição do valor da constante dielétrica do meio e que a polarização do meio ou da molécula é função da constante dielétrica e do campo elétrico (VLACK, L. H. 2000). Dessa forma, trocando-se o solvente do meio, altera-se a constante dielétrica, e, conseqüentemente, a capacidade de deslocamento ou de acomodação da densidade eletrônica é afetada. Ela, por sua vez, irá interferir na oscilação dos plasmons de superfície da partícula.



**Figura. 2.3.1.1.** (a) Fenômeno de Ressonância de Plasmons de Superfície Localizada. (b) Espectro uv-visível de nanopartículas recobertas com dieletros de espessura crescente. Absorbância diminui com o aumento da espessura do dieleto e o comprimento de onda do pico LSPR desloca para direita. (adaptado de MOORES, A & GOETTMAN, F, 2006 e KEMDEM, O. 2012).

## 2.2.4 As Nanopartículas de Ouro.

O universo plasmônico está repleto de novas descobertas, como as nanopartículas de geometrias exóticas, as ligas metálicas e os ligantes para conjugação, e, por conseguinte, novas propriedades e aplicações surgem a cada descoberta. No entanto, a grande maioria dos materiais utilizados está restrita a alguns poucos elementos, cujos principais continuam a ser o ouro e a prata, haja vista a capacidade de produzirem os mais intensos efeitos plasmônicos dentre todos os demais metais. O ouro, por sua vez, apresenta maior estabilidade, maior resistência à oxidação e maior biocompatibilidade do que a prata, despertando, assim, grande interesse analítico, médico e ambiental (BUSSERON, E., *et al.*, 2013; RIOUX, D., *et al.*, 2015).

Diferentemente do dourado característico do ouro em proporções macrométricas, o ouro em escala nanométrica, disposto na forma de dispersões de coloidais, apresenta-se na cor vermelha ou violeta. Diversos tons dessas duas cores podem ser observados quando o tamanho ou a forma das nanopartículas de ouro são alterados. Sabe-se que a cor dessas

dispersões coloidais se deve à oscilação coletiva dos elétrons presentes na banda de condução do metal, e, portanto, também presente no ouro. A frequência de oscilação desse fenômeno ocorre na região visível do espectro eletromagnético e dá origem à intensa absorção observada entre 520 e 800 nm, dependendo da forma e tamanho das partículas, quando os colóides são submetidos à técnica de espectrofotometria (FARADAY, M., 1857; PRASAD, P.N., *et al.*, 2004).

O comprimento de onda de absorção máxima correlaciona-se com o tamanho e a forma da partícula. Nanopartículas de ouro de dimensões menores absorvem em comprimentos de onda menores, enquanto o inverso também é verdadeiro. As nanopartículas na forma de bastonetes, em virtude de sua anisotropia, absorvem em dois comprimentos de onda, um por volta de 755 nm e outro, de menor intensidade, no entorno de 530 nanômetros. Eles produzem dois modos de ressonância, uma longitudinal e outra transversal (MEHTALA, J., *et al.*, 2014). Há também as nanopartículas no formato de estrelas, as quais absorvem toda a extensão da região visível do espectro eletromagnético e também no infravermelho próximo [66]. Há ainda outras, que não serão citadas em virtude da pouca expressividade em relação ao todo. Para cada estrutura de nanopartícula, uma nova estratégia de síntese foi desenvolvida, No entanto, a maioria delas consiste em apenas um incremento das estratégias clássicas, por intermédio da adição de agentes capeadores seletivos (MEHTALA, J., *et al.*, 2014; NEHL, C., *et al.*, 2006).

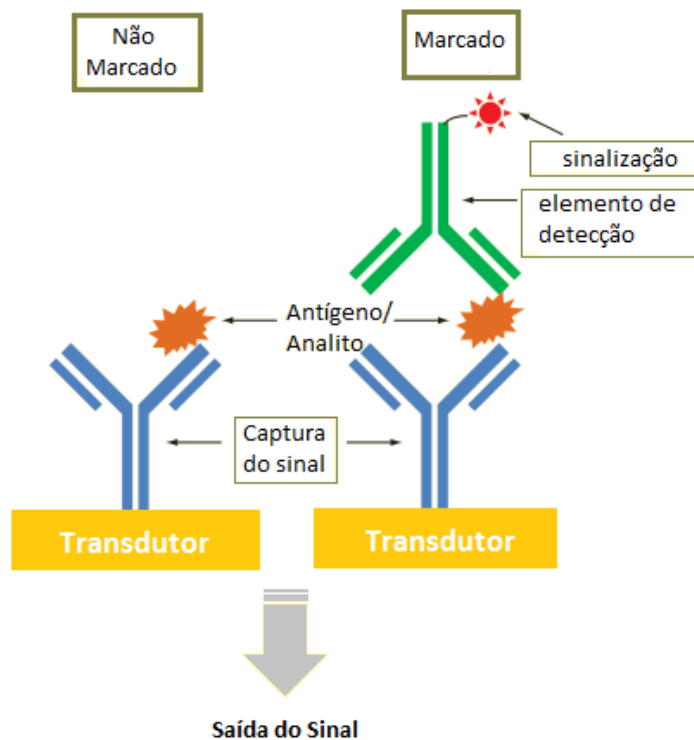
As razões pelas quais novos formatos são desenvolvidos não se devem à estética ou à inovação pela inovação, como pode parecer ao primeiro olhar, haja vista tamanha diversidade de formatos, mas sim, às funcionalidades ímpares capazes de solucionar dilemas atuais. A absorção na região do infravermelho, por exemplo, permite a aplicação das nanopartículas de ouro, em conchas e estrelas, na terapia fototérmica guiada por imagem, a fim de promover a destruição térmica de células tumorais sem afetar tecidos adjacentes e com a facilidade de o procedimento ser guiado por imagem (CHIRICO, G., *et al.*, 2015). Por outro lado, a simples mudança no comprimento de onda de absorção dentro do espectro uv-visível proporciona o melhoramento de sensores cujas matrizes absorvem no mesmo comprimento de onda de partículas usuais, fato este responsável por interferir negativamente na sensibilidade dos sensores (LIN, H.Y. *et al.*, 2014).

Ademais, a possibilidade de somar seletividade à sensibilidade dos nanomateriais, levou à conjugação das nanopartículas com macromoléculas biológicas capazes de reconhecer

antígenos de maneira muito específica na construção dos chamados Nanobiossensores, como é o caso dos anticorpos conjugados a nanopartículas de ouro, cujo analito é denominado antígeno.

### 2.2.5 Nanobiossensores

Um biossensor consiste em um dispositivo dotado de um elemento biológico, normalmente anticorpos, aptâmeros e enzimas, sendo capaz de reconhecer e sensoriar um analito através da interação entre a porção reativa de sua superfície e a do analito. Tal interação entre ambos resulta em um sinal mensurável, a partir do qual, o dispositivo, associado ao transdutor, converte esses eventos em unidades qualitativas ou quantitativas de analito (Figura 2.5.1). Apesar de o termo sensor referir-se ao sensoriamento e não à detecção, não é raro encontrar o vocábulo sensor referindo-se a mecanismos de detecção, a diferença entre eles consiste na reversibilidade que os sensores apresentam após a realização do ensaio. Já os transdutores podem ser distribuídos em categorias conforme a magnitude física reconhecida, tais como, eletroquímica, piezoeétrica, termométrica e óptica (NARSAIAH, K., *et al.*, 2012).

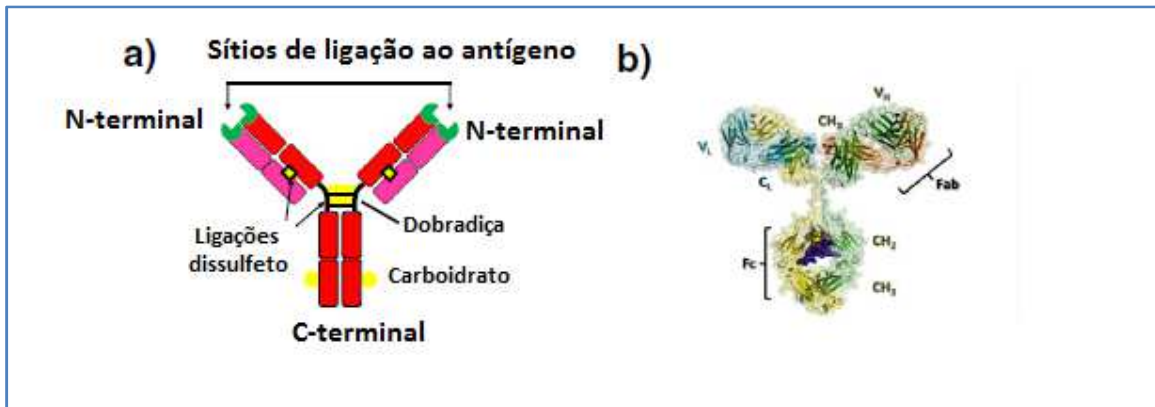


**Figura 2.5.1.** Representação esquemática de ensaios marcados e não marcados de biossensores utilizando anticorpos. Adaptado de SIN, M.L.Y. *et al.*, 2014.



Os biossensores ópticos são amplamente empregados no campo da segurança alimentar devido, principalmente, à capacidade de analisar matrizes complexas exigindo mínimo tratamento prévio das amostras. Frequentemente, baseiam-se em mudanças nas características da superfície do sensor em resposta à interação entre o agente reconhecedor e o analito. Nesses casos, a seleção correta da fonte de luz é importante para evidenciar os diferentes fenômenos explorados nos biossensores ópticos (ANKER, J.N. *et al.*, NARSAIAH, K., *et al.*, 2012). Os nanobiossensores, por sua vez, caracterizam-se pela presença de um transdutor em escala nanométrica, a partir do qual o sinal pode ser convertido e/ou amplificado (SIN, M.L.Y. *et al.* 2014).

Os imunossensores baseados em interações antígeno-anticorpo específicas são técnicas historicamente conhecidas, utilizadas e estudadas (Figura 1). Os anticorpos são proteínas de elevado peso molecular responsáveis por identificar e neutralizar uma parte única de um determinado alvo externo, chamado de antígeno. Existem cinco classes de imunoglobulinas (anticorpos), as quais são : IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. As imunoglobulinas da classe IgG são as mais abundantes do soro sanguíneo e as mais utilizadas para técnicas de biofuncionalização de nanopartículas. A estrutura básica do IgG pode ser visualizada na Figura 2.5.2., a qual compreende duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas, as quais pesam cerca de 150 kDa e apresentam um tamanho médio de  $14,5 \times 8,5 \times 4 \text{ nm}^3$ . A cadeia leve contém um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL), enquanto a cadeia pesada apresenta uma porção variável (VH) e três porções constantes (VL-VH). As quatro cadeias de proteínas estão ligadas entre si formando uma estrutura em “Y”. Os IgGs contêm duas regiões de ligação ao antígeno localizadas na porção final das duas estruturas amino-terminais, as quais são os “braços” do “Y”, cujo nome é fragmento Fab (*antigen-binding Fragment*, ou seja, Fragmento de Ligação ao Antígeno). A terceira estrutura apresenta uma porção carbóxi-terminal, denominada de fragmento Fc ou porção Fc (cristalizável Fragment, isto é, fragmento cristalizável), a qual é responsável por gerar a resposta imune apropriada (AMIT. A.; 1986; MONTENEGRO, J.M., *et al.*, 2013).



**Figura 2.5.2.**(a) Esquema de uma imunoglobulina, as duas cadeias leves em rosa e as duas cadeias pesadas em vermelho. (b) Modelo tridimensional de um Anticorpo obtida a partir de cristalografia de raios - X. Adaptado de Montenegro, J.M., *et al.*, (2013).

Tais imunoglobulinas produzidas por células do sistema imunológico denominadas linfócitos B. Os anticorpos produzidos podem dividir-se em monoclonais e policlonais, os anticorpos monoclonais possuem especificidade por um único epítipo enquanto os policlonais são capazes de se ligarem a múltiplos epítipos (WOOF *et al.*, 2004, TOKONAMI *et al.*, 2009). Os epítipos consistem na menor porção de um antígeno com potencial de gerar uma resposta imune, isto é, consiste na porção do antígeno (neste caso é o analito) que interage com a porção específica do anticorpo. Nos imunoenaios, a interação entre essas porções é altamente específica para um alvo particular e esta reação imunoquímica pode ser convertida em fenômeno mensurável pelo transdutor, como um sinal óptico ou eletrônico (TOKONAMI *et al.*, 2009, RONKAINEN *et al.*, 2010).

As Ressonâncias de Plasmons de Superfície localizada conduzem a uma absorção seletiva e estreita do espectro eletromagnético e a uma intensificação do confinamento do campo de luz na superfície e no entorno da partícula. Esses eventos são facilmente detectados pelas técnicas espectrofotométricas levando a uma grande aplicabilidade na detecção e no sensoriamento (FREDERIX F, *et al.*, 2003).

### **3 OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADAS**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

Determinar a potencialidade do uso de nanopartículas de ouro coloidais na detecção de de Ocratoxina A utilizando o fenômeno de Ressonância Plasmons de Superfície Localizada.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Sintetizar nanopartículas de ouro monodispersas e esféricas através da redução com citrato;

- Caracterizar as nanopartículas sintetizadas com base na microscopia eletrônica de transmissão, mobilidade eletroforética, espectrofotometria no uv-visível, espectrometria no infravermelho e espectroscopia Raman;
- Adsorver os anticorpos Anti-Ocratoxina A determinando as melhores condições;
- Delinear e realizar os ensaios de detecção de Ocratoxina A ;
- Determinar a potencialidade de detecção através da sensibilidade atingida e determinar os pontos críticos e a vulnerabilidade.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Síntese das Nanopartículas de Ouro**

Previamente à síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs), todas as vidrarias foram lavadas com solução “*aqua regia*”, a qual consiste em uma mistura de ácido nítrico e ácido clorídrico concentrados, na proporção 1:3 (1HNO<sub>3</sub>:3HCl). Em seguida, lavou-se abundantemente com água destilada, fez-se o ambiente com água ultrapura, secando em estufa a 60°C. Após, aproximadamente, 1 hora foram preparadas duas soluções estoque para a síntese de AuNPs: uma solução aquosa de citrato de sódio tribásico (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>), na concentração de 1% (3,4.10<sup>-2</sup>M), e uma solução aquosa de ácido tetracloroáurico tri-hidratado

( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) na concentração de  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$  de ouro (Au), utilizando água ultrapura como solvente.

Para a reação química de síntese das AuNPs, adicionou-se 1 mL da solução de citrato em 15 mL de solução de ácido tetracloroáurico, à temperatura de  $100^\circ\text{C}$ . A mistura foi submetida à agitação de 400 rpm durante 15 minutos, tempo no qual houve a estabilização da cor vermelha característica do ouro coloidal. O ouro coloidal foi resfriado em banho de gelo, acondicionado em frascos estéreis do tipo “*Falcon*” e armazenados em geladeira ( $2-8^\circ\text{C}$ ) para uso posterior.

## **4.2. Caracterização das Nanopartículas de Ouro**

### **4.2.1 Caracterização das AuNP utilizando a Espectrofotometria no Uv-Visível**

Para a caracterização das AuNPs no Uv-Visível foram utilizadas cubetas de quartzo previamente lavadas com detergente, água e água destilada, em seguida, foi feito o ambiente com água ultrapura. Para a análise, utilizou-se o volume de 2 mL de ouro coloidal resfriado, recém-preparado, que foi acondicionado em uma cubeta de quartzo. Para o branco, utilizou-se água ultrapura. A cubeta com o colóide foi introduzida no porta-amostras do espectrofotômetro Evolution<sup>TM</sup>300, da Thermo. Então, realizou-se a leitura da absorbância no intervalo de 400 a 800 nanômetros.

### **4.2.2 Caracterização das AuNP pela Microscopia Eletrônica de Transmissão.**

As nanopartículas foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1400, JEOL, USA inc.), operando a 120 kV. Cerca de  $10\mu\text{L}$  das amostras foram gotejadas sobre grades de cobre de 400 mesh, contendo um filme suporte de resina formvar e secas a temperatura ambiente.

As imagens do Microscópio Eletrônico de Transmissão foram obtidas em diferentes aumentos (25 000X; 300 000X) visando obter informações gerais da amostra, e imagens mais detalhadas das nanopartículas quanto a forma e tamanho.

#### **4.2.3 Caracterização das AuNP utilizando o Potencial Zeta**

O equipamento utilizado para a análise das nanopartículas e do potencial zeta é o Analisador de tamanho de partículas da Microtrac modelo Zetatrac NPA152. Para o teste, uma alíquota de 2 mL da dispersão coloidal de nanopartículas são adicionados em uma cubeta de teflon contendo um par de eletrodos de paládio para a medida do potencial zeta, que é determinado via mobilidade eletroforética das partículas à temperatura ambiente (25°C).

#### **4.2.4 Caracterização das AuNP utilizando a Espectrometria no Infravermelho.**

Para a caracterização no IV, 2 mililitros do colóide foram acondicionados em um tubo *ependorf* de 2 mililitros, o tubo foi inserido em uma microcentrífuga, o qual foi centrifugado na velocidade de 10.000 RPM. Após 30 minutos, o sobrenadante foi coletado com uma micropipeta automática de 1000 µL e descartado, adicionou-se, então, uma nova alíquota de 2 mL de AuNPs, que foi novamente centrifugada, repetindo o procedimento anterior. Após a ressuspensão do colóide com a terceira alíquota de 2 mL de ouro coloidal, o frasco foi centrifugado a vácuo, utilizando o equipamento Speed-Vac, da Labconco, para evaporação do solvente. Em seguida, o tubo foi armazenado em geladeira.

Após 24 horas, o sedimento foi submetido à análise vibracional de espectrometria no infravermelho com Transformada de Fourier FT-MIR/FTLA 2000, da Bomem. A transmitância/absorbância foi mensurada nas frequências vibracionais entre 4.000 cm<sup>-1</sup> a 600 cm<sup>-1</sup> (2,5 µm a 16,6 µm).

#### **4.2.5 Caracterização das AuNPs utilizando a Espectroscopia Raman.**

Previamente à análise espectroscópica Raman, as amostras foram processadas da mesma maneira que a realizada para o infravermelho, excetuando-se a etapa de evaporação com centrifugação a vácuo. Ou seja, 2 mililitros do colóide foram acondicionados em um tubo *ependorf* estéril de 2 mililitros e este foi centrifugado à velocidade de 10.000 RPM. Após 30 minutos, o sobrenadante foi coletado e descartado, adicionou-se, então, uma nova alíquota de 2 mL do ouro coloidal, a qual foi novamente centrifugada, repetindo-se o procedimento anterior. Após a ressuspensão do colóide com a terceira alíquota de 2 mL de AuNPs, retirou-se uma alíquota de 1 mL da suspensão e gotejou-a sobre uma lâmina de vidro, previamente

lavada com *aqua regia* e água destilada e água ultrapura. Em seguida, a lâmina foi deixada em estufa a 50°C até a completa secagem.

Para a análise Raman, posicionou-se a lâmina de vidro sob a objetiva do Microscópio Confocal ALPHA 300R, que está acoplado a um espectrômetro Raman com lasers de 532 nm e 633 nm. A leitura do espalhamento Raman foi realizada com o laser de 532 nm e nas frequências vibracionais entre 500cm<sup>-1</sup> e 4000cm<sup>-1</sup>.

O mesmo procedimento foi realizado para analisar o espalhamento Raman das nanopartículas com anticorpos. Foram utilizados 10µL de anticorpos na concentração de 25µg.mL em 100uL de suspensão de nanopartículas de ouro.

### **4.3 Conjugação de Partículas de Ouro Coloidal com Anticorpos**

#### ***“Gold Number”***

As nanopartículas de ouro foram preparadas a partir da síntese química previamente descrita, na qual, adicionou-se 1 mL de citrato de sódio tribásico (1%) a 15 mL de ácido tetracloroáurico (2,5x10<sup>-4</sup>M), na temperatura de 100°C, agitação à 400 rpm e tempo de 15 minutos. Após a síntese, a dispersão de ouro coloidal foi dividida em dois tubos, em cada tubo foi feito o ajuste de pH, no primeiro ajustou-se para 7 e, no outro, para 9, utilizando uma solução de carbonato de sódio (0,2M). O pH do colóide foi conferido utilizando papel de pH.

A formação de complexos anticorpo-ouro coloidal exige, além do pH de complexação, uma concentração mínima de anticorpos que seja capaz de estabilizar as partículas de ouro. Portanto, deve-se encontrar a concentração ótima de imunoglobulina que deverá ser complexada. O método utilizado para obtenção desta concentração é conhecido por *“Gold Number”*. O *Gold Number* é definido como o número, em miligramas, da substância protetora que previne a mudança de cor de 10 mL de uma solução de ouro coloidal na presença de 1 mL de uma solução de cloreto de sódio 10%. O teste foi realizado em duplicata para realização do teste nos dois pHs ajustados. A determinação do resultado pode ser feita através de leitura espectrofotométrica ou por método prático, a olho nu. Para o estudo, escolheu-se o método prático em virtude do menor volume exigido para esta técnica.

Primeiramente, adicionou-se 10 $\mu$ L de água ultrapura em 10 poços, começando a partir do segundo poço de uma fileira de 11 poços, de uma microplaca para ELISA (96 poços, 250 $\mu$ L). Depois, diluiu-se a proteína em água ultrapura formando 40 $\mu$ L de solução estoque na concentração de 250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Sequencialmente, retirou-se uma alíquota de 10 $\mu$ L da solução estoque, transferindo-a para o primeiro poço da sequência de 11 poços. Uma segunda alíquota de 10  $\mu$ L de solução estoque de anticorpo foi adicionada ao segundo poço, preenchendo um volume de 20  $\mu$ L. Após a homogeneização com uma micropipeta, empregando 20 sucções para cada transferência, transferiu-se 10 $\mu$ L do segundo poço para o terceiro, do terceiro para quarto e assim por diante, até o décimo poço. A última alíquota foi descartada, deixando o décimo primeiro poço apenas com 10 $\mu$ L de água ultrapura. Após esta etapa, 100  $\mu$ L de dispersão de nanopartículas de ouro foram adicionados a todos os poços, agitando levemente por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 10 $\mu$ L de uma solução de cloreto de sódio a 10%, agitando por 2 minutos.

O gradiente de cor, formado na sequência de poços da placa para ELISA, demonstrou que foram necessários 10 $\mu$ L da solução estoque de anticorpo (250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) para estabilizar 100 $\mu$ L da dispersão de ouro coloidal salinizada. Isto significa dizer que a concentração mínima de anticorpo Anti-Ocratoxina A necessária para estabilizar a dispersão de nanopartículas de ouro (*Gold Number*) foi de 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.4. Detecção de Ocratoxina A em Sistema Controlado**

Previamente ao teste, preparou-se uma solução etanólica de Ocratoxina A na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, utilizando 1mg de Ocratoxina A liofilizada (Sigma Aldrich) em 1 mL de etanol anidro (Merck), a partir da qual, foram preparadas as demais soluções empregadas nos testes. A solução estoque foi então acondicionada em 10 microtubos com um volume de 100 $\mu$ L de Ocratoxina A (1 mg.mL<sup>-1</sup>) em cada microtubo, que foram armazenados congelados a -20°C, para uso posterior.

Durante os testes, foram avaliados os solventes (água ultrapura e diluente de anticorpo da Spring Bioscience, lote 130403A, pH 7,4) e as contribuições de cada componente do sensor para o sinal obtido. Ou seja, foram realizados os testes de detecção de OTA apenas na presença de nanopartículas, apenas Ocratoxina A e o sistema completo.



### **Avaliação do Solvente**

Para avaliar a água ultrapura como solvente, foram preparadas, anteriormente à execução do teste, cinco soluções de Ocratoxina A nas concentrações de  $1,0 \cdot 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-4} \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1,0 \cdot 10^{-5} \mu\text{g.mL}^{-1}$ . As alíquotas adicionadas consistiram em  $1 \mu\text{L}$  cada e continham concentrações crescentes de Ocratoxina A. A cada adição, conforme citado no parágrafo anterior, agitou-se a placa levemente por 2 minutos, realizando, em seguida, a leitura espectrofotométrica. Para a concentração mais baixa de OTA ( $1,0 \cdot 10^{-7} \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), utilizou-se  $1 \mu\text{L}$  da solução mais diluída, previamente preparada ( $1,0 \cdot 10^{-5} \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em  $110 \mu\text{L}$  de AuNPs estabilizadas por anticorpos. Sequencialmente, para atingir a segunda concentração estipulada,  $1,0 \cdot 10^{-6} \mu\text{g.mL}^{-1}$ , adicionou-se  $1 \mu\text{L}$  da solução de concentração  $1,0 \cdot 10^{-4} \mu\text{g.mL}^{-1}$  de OTA. As alíquotas continuaram sendo adicionadas até a maior concentração testada,  $2,0 \cdot 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$ , procedendo com a agitação e leitura entre cada etapa, totalizando  $25 \mu\text{L}$  provenientes das seis soluções previamente preparadas, solução estoque e soluções derivadas, adicionados a  $110 \mu\text{L}$  de dispersão.

Tendo em vista que o pH ideal para o reconhecimento antígeno-anticorpo consiste em valores próximos ao pH fisiológico (pH7), o primeiro solvente testado para o sistema foi o diluente de anticorpo, composto por azida sódica, tampão fosfato, e pH 7,4. Para tanto, avaliou-se a dispersão diluída a 50% e a 10% no diluente de anticorpo citado. Foram adicionadas alíquotas de  $1 \mu\text{L}$  e com concentrações crescentes de ocratoxina A. A cada adição, agitou-se a placa levemente por 2 minutos, realizando, em seguida, a leitura espectrofotométrica no intervalo de 400 a 800nm.

O experimento procedeu da seguinte forma: primeiramente, foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  de AuNPs, pH ajustado para 9, ao primeiro poço de uma placa para ELISA de 96 poços. Realizou-se, então, a leitura espectrofotométrica entre 400 e 800nm. Em seguida, foram adicionados  $10 \mu\text{L}$  de anticorpo diluído em água ultrapura na concentração de  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A mistura foi agitada levemente durante 2 minutos e introduzida no leitor espectrofotométrico para nova leitura. As concentrações testadas para a diluição a 10% variaram entre  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo 10 alíquotas de  $1 \mu\text{L}$  da solução estoque adicionadas, sequencialmente, a  $110 \mu\text{L}$  presentes no sistema, totalizando  $120 \mu\text{L}$ .

Na diluição a 50% testou-se de  $0,05\mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $75,6\mu\text{g.mL}^{-1}$  de OTA, em 11 alíquotas de  $1\mu\text{L}$  cada, totalizando  $11\mu\text{L}$ . Para isso, foram preparadas três soluções de OTA nas concentrações de  $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A primeira alíquota consistiu em  $1\mu\text{L}$  da solução mais diluída de OTA,  $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ , adicionado a  $110\mu\text{L}$  presentes no sistema, sequencialmente, respeitando a agitação, o tempo e as leituras entre cada etapa, adicionou-se uma segunda alíquota de  $1\mu\text{L}$  da mesma solução, formando assim, a segunda concentração testada,  $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A terceira e quarta concentrações testadas,  $0,6\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $5,6\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram formadas a partir da adição sequencial de  $1\mu\text{L}$  das soluções de  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$  e de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  de OTA, respectivamente. A partir da quinta concentração avaliada,  $15,6\mu\text{g.mL}^{-1}$ , utilizou-se  $1\mu\text{L}$  da solução estoque de OTA até atingir a maior concentração testada,  $75,6\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### **Avaliação da Saturação do Sistema**

Para avaliar a influência de altas concentrações de Ocratoxina A, utilizaram-se as soluções-estoque para adicionar concentrações crescentes de OTA em dois poços de uma placa de ELISA de 96 poços, nos quais havia  $110\mu\text{L}$  de nanopartículas com anticorpos em pH 9. Sequencialmente, procedeu-se com a leitura espectrofotométrica em cada poço e as concentrações avaliadas foram entre  $0,01$  e  $75,6\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### **Avaliação do Sistema na Ausência de Anticorpos**

Da mesma forma que o observado para o solvente utilizado, é possível que cada componente do sistema de detecção, quando em contato com o analito, seja capaz de exercer influência sobre o sinal obtido, interferindo, assim, na interpretação dos resultados encontrados. Por isso, é importante avaliar as contribuições isoladas dos componentes sobre a detecção de Ocratoxina A. Dessa forma, avaliaram-se os componentes AuNPs e analito, separadamente, frente a adições consecutivas de solução de OTA.

Para isso, realizou-se o teste de detecção de Ocratoxina A na dispersão coloidal sem a adição prévia dos anticorpos, cujo objetivo foi investigar alguma interação entre a Ocratoxina A e as nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato. Primeiramente, foram adicionados  $10\mu\text{L}$  de água ultrapura em  $100\mu\text{L}$  de AuNPs no primeiro poço da terceira fileira

da placa de ELISA de 96 poços. A placa foi agitada por 2 minutos e levada para leitura espectrofotométrica. A partir daí, foi realizado o mesmo procedimento descrito para o sistema diluído a 10% em diluente de anticorpo. Ou seja, partiu-se de  $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$ , chegando a  $155,6\mu\text{g.mL}^{-1}$ , através de adições consecutivas de alíquotas de  $1\mu\text{L}$  provenientes das três soluções, previamente preparadas, que foram citadas no referido teste e partindo, também, da solução estoque ( $1\text{mg.mL}^{-1}$ ). Foram adicionadas 13 alíquotas, totalizando  $13\mu\text{L}$  adicionados a  $110\mu\text{L}$  de dispersão coloidal. As leituras espectrofotométricas foram realizadas entre cada adição após 2 minutos de agitação da placa para ELISA e no intervalo de  $400\text{nm}$  a  $800\text{nm}$

### **Avaliação do Índice de Refração em pequenas doses de Etanol e da Glicerina**

Este teste foi realizado com o intuito de verificar se o índice refração dessas duas substâncias em volumes crescentes seriam capazes de interferir na intensidade da absorbância colóide de AunP. Pois, dessa forma, poder-se-ia confirmar ou descartar a formação de uma segunda esfera de coordenação entre as moléculas de Ocratoxina A e as partículas na ausência de anticorpo. Foi feito um teste utilizando alíquotas crescentes de etanol e de glicerina no espectro das nanopartículas coloidais. Para isso foram adicionadas alíquotas crescentes de etanol, partindo de  $100\mu\text{L}$  e chegando a  $170\mu\text{L}$ , em  $1\text{mL}$  de dispersão. A primeira alíquota foi de  $100\mu\text{L}$  e as demais foram de  $10\mu\text{L}$ . Para a glicerina, utilizou-se alíquotas de  $100\mu\text{L}$  em  $2\text{mL}$  de dispersão, o volume final de glicerina adicionado foi de  $380\mu\text{L}$ . A cada alíquota foi medida a absorbância no espectrofotômetro Uv-Visível.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Aqui, estão dispostos os dados de todos os testes realizados. A discussão dos resultados acompanha um conjunto de dados complementares entre si. Ao final, são citados alguns trabalhos relevantes que tenham semelhança com o princípio explorado no presente estudo.

### **5.1 Caracterização das Nanopartículas Sintetizadas.**

A caracterização do colóide foi realizada com intuito de: i) confirmar a formação das nanopartículas, utilizando para isso, a leitura da absorvância no espectro uv-visível; ii) determinar o diâmetro e a forma, através do cálculo realizado a partir das absorvâncias e por meio da microscopia eletrônica de transmissão; iii) inferir a estabilidade da dispersão coloidal com base em sua carga eletrocinética; iv) determinar os grupos funcionais do meio e comparar suas alterações após a reação de síntese, que foi realizada através da espectrometria no infravermelho; v) determinar quais grupos funcionais interagem com as nanopartículas, através da espectroscopia Raman e apropriando-se do efeito de Espalhamento Raman Intensificado por meio de Superfície (SERS).

Para cada técnica utilizada descrita neste item do trabalho, faremos uma breve descrição dos princípios explorados pelas mesmas antes de analisarmos e discutirmos os resultados encontrados..

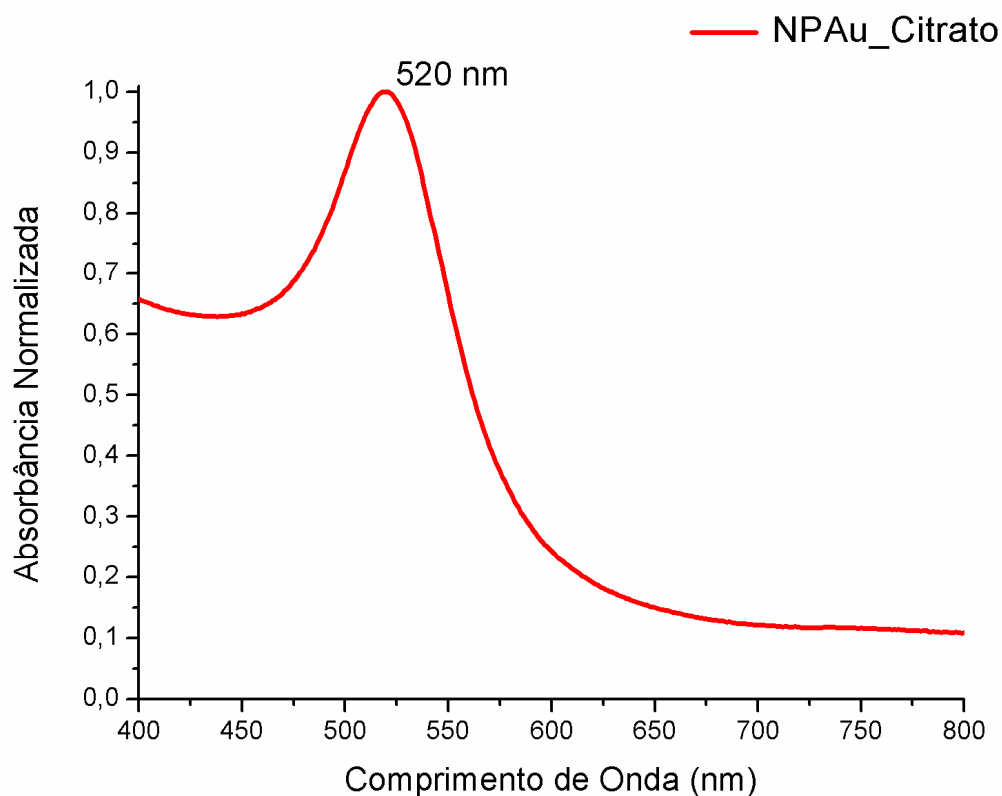
### **5.1.1. Espectrofotometria no Uv-Visível**

A absorção é o fenômeno, no qual, uma radiação incidente sobre uma partícula tem uma fração de sua energia eletromagnética transformada em energia interna da partícula, a qual, dependendo da estrutura eletrônica e da distribuição dos níveis quânticos da partícula, poderá ou não ser irradiada novamente. Já o espalhamento da radiação consiste em um fenômeno físico, no qual, uma onda eletromagnética, ao incidir sobre uma partícula, tem parte de sua energia absorvida e reirradiada na forma de ondas eletromagnéticas em todas as direções. A intensidade relativa com que a radiação é espalhada está relacionada à razão entre o tamanho da partícula e o comprimento de onda da radiação incidente. Uma equação conhecido pelo nome de Parâmetro de Tamanho de Mie demonstra a relação existente entre o tamanho de uma partícula e o comprimento de onda de uma radiação incidente para o caso de partículas maiores que o comprimento de onda da radiação incidente. Para partículas menores, aplica-se a chamada Teoria do Espalhamento Rayleigh, cujo espalhamento é semelhante ao produzido pelas moléculas. No entanto, a teoria que descreve o espalhamento produzido por partículas, cujas dimensões são da mesma ordem de grandeza da onda eletromagnética incidente é a Teoria de Mie. Essa teoria permite que o espectro de absorção de dispersões coloidais formadas por partículas esféricas possa ser calculado a partir da relação existente entre o comprimento de onda e constantes ópticas das partículas relativas ao meio

circundante, tais como o índice de refração ( $n$ ) e a permissividade relativa da frequência óptica ( $\epsilon$ ) (ECHER, E., *et al.*, 2001; YOUNG, H.,D., *et al.*, 2003).

Dessa forma, quando uma nanopartícula metálica interage com um feixe de luz, uma parte dos fótons incidentes é absorvida e uma parte é espalhada. Nesse caso, tanto a absorção quanto o espalhamento são exponencialmente intensificados em virtude da excitação da ressonância dos plasmons da superfície da partícula, resultando em uma intensa extinção da luz. As dispersões coloidais metálicas apresentam bandas de absorção no intervalo ultravioleta - visível do espectro eletromagnético e se deve tanto à excitação dos plasmons quanto às transições de bandas, que constituem uma das principais características da natureza metálica das partículas (CREIGHTON, J. A. *et al.* 1991).

O comportamento óptico da dispersão coloidal foi monitorado através do espectro de absorção utilizando um espectrofotômetro no intervalo de 400 a 800 nm , que confirmou a formação das AuNPs devido à intensa banda de absorção verificada no entorno de 520 nm (Figura 5.1.1), comumente observada na literatura (EUSTIS, S.,*et al.* 2006). A suspensão mostrou intensa extinção da luz no comprimento de onda característico da ressonância de plasmons de superfície localizada para nanopartículas esféricas de ouro. O perfil estreito da banda demonstra boa homogeneidade de tamanhos e formas e ausência de agregação, uma vez que as bandas que se estendem para a direita indicam diâmetros maiores e o aumento na intensidade de absorção nas regiões acima de 600 nm indicariam agregação das NPAus. A extinção da luz observada próximo à região do ultravioleta, 400 nm, deve-se ao espalhamento provocado pelas nanopartículas, que ao serem irradiadas por essa onda eletromagnética de alta energia, espalham fortemente a radiação incidida. Isso se deve ao fato de que a intensidade da dispersão da luz varia com a quarta potência da frequência, dessa forma, um menor comprimento de onda provoca uma dispersão mais forte da luz. Além disso, o diâmetro das partículas influencia positivamente na intensidade do espalhamento nessa região.



**Figura 5.1.1.1** Espectro de absorção das nanopartículas de ouro sintetizadas utilizando o ácido tetracloroáurico trihidratado e o citrato de sódio tribásico.

Através do espectro no uv-visível foi possível determinar o tamanho majoritário e a concentração das nanopartículas de ouro sintetizadas em virtude da interdependência entre as propriedades ópticas dos espectros, o tamanho das partículas e o comprimento de onda da colóide. Com o intuito de facilitar o cálculo das complexas equações envolvidas no método, Wolfgang, H.(2007) desenvolveu uma forma simples de estimar o tamanho e a concentração de nanopartículas de ouro sintetizadas com o citrato utilizando apenas três parâmetros, a absorbância do colóide no comprimento de onda de 450 nm ( $A_{450}$ ), a absorbância máxima ( $A_{SPR}$ ) e o coeficiente de extinção molar em 450 nm ( $\epsilon_{450}$ ), tabulado para diferentes diâmetros de nanopartículas e validado experimentalmente. A primeira etapa envolve a razão entre a absorbância máxima e à 450 nm para determinar o tamanho das nanopartículas de ouro. Sequencialmente, verifica-se em uma tabela confeccionada a partir de dados experimentais e equações teóricas, o coeficiente de extinção decimal molar correspondente àquele tamanho de nanopartícula encontrado, para, em seguida, calcular a concentração de partículas em mol por litro através da razão entre a absorbância máxima e o coeficiente de extinção molar.

Dessa forma, o diâmetro médio ( $d$ ) das partículas na dispersão sintetizada pôde ser calculado, e para isso, utilizou-se a razão:

$$d = A_{SPR} \div A_{450} \quad \text{equação (2)}$$

Na qual, a partir do espectro uv-visível,  $A_{SPR}$  é igual a 0,920121 e  $A_{450}$  corresponde a 0,559292, resultando em 1,65, o qual corresponde a um diâmetro de 16 nm, obtido a partir da conferência dos dados tabulares. A concentração ( $c$ ) da nanopartícula, por sua vez, pode ser calculada a partir da razão:

$$c = A_{450} \div \mathcal{E}_{450} \quad \text{equação (3)}$$

O coeficiente de extinção decimal molar ( $\mathcal{E}_{450}$ ) consiste em uma propriedade característica das substâncias e depende da frequência da luz utilizada na irradiação. Ele pode ser definido como a capacidade da matéria em extinguir a luz em um comprimento de onda específico. Por tanto, é uma propriedade intrínseca, de modo que, se em um solvente se encontrarem dissolvidas várias substâncias em diferentes concentrações, o coeficiente de extinção decimal molar da mistura é o somatório dos produtos entre os coeficientes individuais e a concentração molar de cada substância (WEDLER, G., *et al*, 2001). Aqui, o valor de  $\mathcal{E}_{450}$  foi obtido por meio de uma tabela, na qual, os  $\mathcal{E}_{450}$  foram previamente estabelecidos e tabulados para diferentes razões  $A_{SPR}/A_{450}$  de nanopartículas de ouro, e corresponde a  $2,67 \cdot 10^8$  para a razão encontrada entre as absorvâncias determinadas no espectro uv-visível. Logo, seguindo a Equação 3, a concentração em mols de partícula por litro pôde ser determinada e equivale a  $2,094 \cdot 10^{-9}$ . Uma vez que um mol de partículas é definido por  $6,022 \cdot 10^{23}$  partículas,  $2,094 \cdot 10^{-9}$  mol equivale a  $1,261 \cdot 10^{15}$  partículas por litro de dispersão, sendo esta a concentração do colóide sintetizado. A concentração de partículas é importante para comparar os rendimentos das sínteses e ajustar os parâmetros, tais como, temperatura, tempo e concentração de precursor e redutor. Além disso, pode auxiliar na investigação de resultados experimentais ou determinar a concentração necessária de um determinado ligante, tal como um anticorpo.

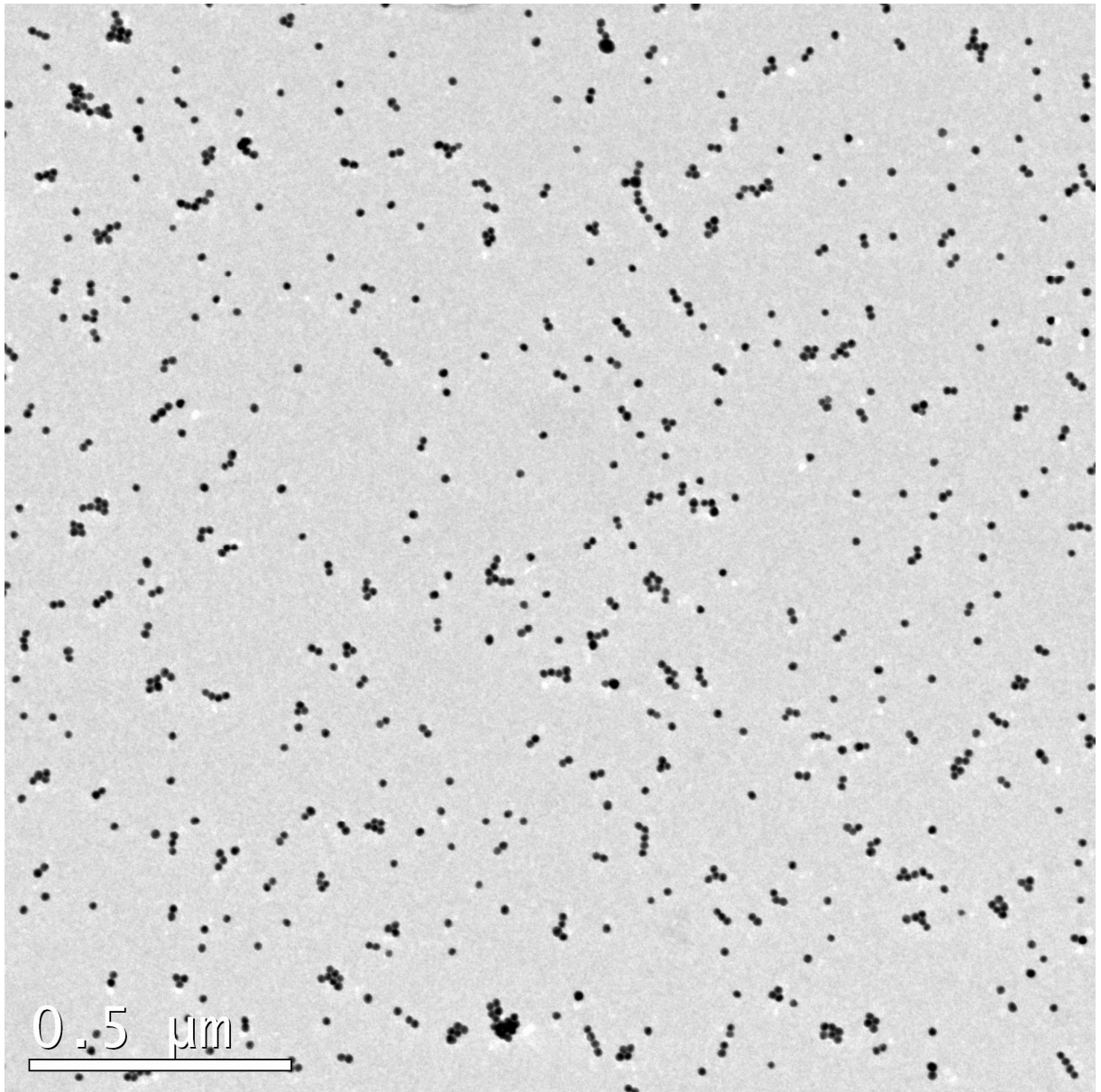
### 5.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As microscopias eletrônicas são as principais técnicas para caracterização da morfologia das nanopartículas. A magnificação máxima convencional dos microscópios ópticos é cerca de 1000x e para atingir uma resolução melhor, o comprimento de onda da radiação sobre a imagem necessita ser diminuído. Na microscopia eletrônica o elétrons são acelerados a altas energias, entre 2 e 1000 keV, ou seja, comprimentos de onda de 0.027 a 0.0009 nm (VERNON-PARRY, 2000). A imagem consiste no mapeamento de intensidade originado pela interação do feixe de elétrons transmitidos e espalhados através e pela amostra. Ao interagir com a camada fina da amostra, o feixe de elétrons sofre alterações que permitem identificar diferentes contrastes na imagem, como acontece, por exemplo, com a massa dos átomos pelos quais o material é composto (REIMER, L.2013).

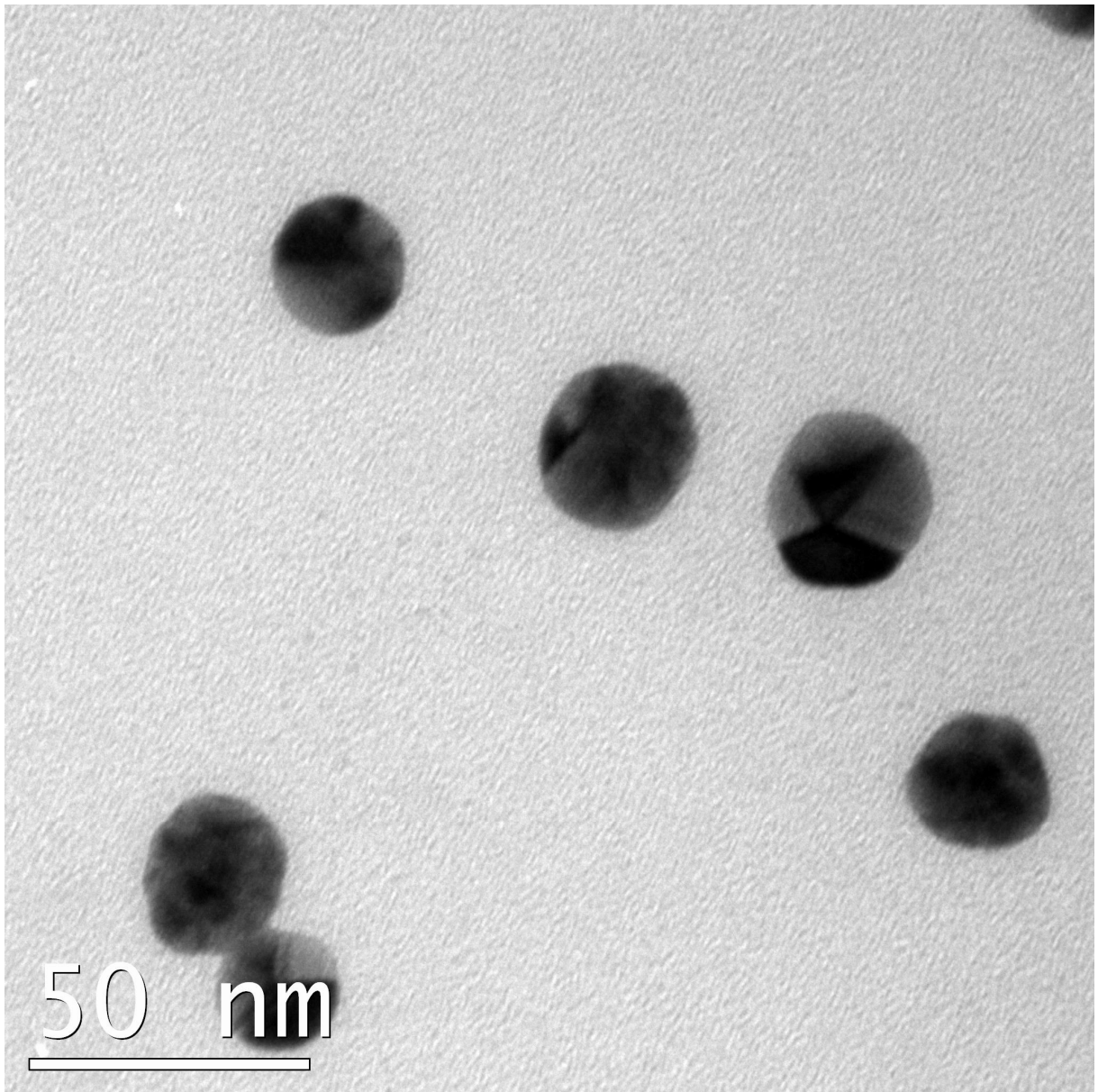
O Microscópio Eletrônico de Transmissão é constituído basicamente por um sistema de emissão de elétrons, uma coluna na qual se encontra o sistema de lentes, um sistema de aquisição de informação e um porta amostras. As fontes de emissão de elétrons mais utilizadas são as de emissão termiônica, as quais compreendem os filamentos de tungstênio e de LaB<sub>6</sub>, e a de emissão de campo (Field Emission Gun - FEG). Os canhões de emissão de campo, devido às suas características de alto brilho e coerência, são necessários para imagens de ultra-alta resolução ou microscopia analítica (REIMER, L. 2013).

Através do MET realizou-se a imagem das nanopartículas de ouro sintetizadas com o citrato de sódio. As imagens obtidas revelam nanopartículas monodispersas e esféricas. Ao aumentar a imagem, é possível visualizar algumas partículas, as quais apresentam-se menores do que a barra de medição de 50 nm. Conforme o tópico 5.1., o cálculo realizado para determinação do tamanho revelou que a maior parte das partículas encontram-se próximas à 16 nm. Dessa forma, é possível perceber que o cálculo e a imagem estão próximos de um mesmo resultado (Figuras 5.1.2.1 e 5.1.2.2)





**Figura 5.1.2.1** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio.



**Figura 5.1.2.2.** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio.

### 5.1.3. Determinação do Potencial Zeta

O Potencial Zeta ( $\xi$ ) expressa o potencial de superfície das partículas coloidais, o qual abrange os íons adsorvidos e atraídos eletrostaticamente até uma interface. Também chamado de carga eletrocinética, o potencial zeta é calculado a partir da mensuração da mobilidade eletroforética ( $\mu$ ) das partículas. A fórmula de mobilidade de Smoluchowski consiste em uma forma muito difundida para o cálculo do potencial zeta a partir da mobilidade eletroforética e depende da permissividade do meio e do vácuo, da viscosidade e da mobilidade eletroforética, conforme mostrado abaixo:

$$\mu = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \xi}{\eta} \quad \text{equação (4)}$$

É possível apreender quais parâmetros se correlacionam diretamente com a carga eletrocinética da partícula. A mobilidade eletroforética, por sua vez, correlaciona-se, principalmente, com o tamanho da partícula, com a presença e tipos de ligantes e com a concentração de eletrólitos (AGNIHOTRI, S., *et al.*, 2009, TENNYSON, L.D. *et al.*, 2012). Entretanto, outras formas de calcular podem levar em consideração outros fatores, além daqueles previstos pela equação mais simples citada, tal qual a equação de Henry, que utiliza a função de Henry ( $f(\kappa R)$ ), na qual  $\kappa$  é a espessura da camada difusa e  $R$  é o raio da partícula.

$$\mu = \frac{\varepsilon \xi f(\kappa R)}{1,5\eta} \quad \text{equação (5)}$$

As duas equações tornam-se a mesma devido ao fato de Smoluchowski atribuir à função de Henry um valor constante de 1,5. O potencial zeta é uma consequência dos princípios eletrocinéticos que regem os sistemas coloidais. Sabe-se que as cargas opostas contidas em sólidos e líquidos são responsáveis pelos fenômenos eletrocinéticos que eles apresentam. Tais cargas originam-se de três mecanismos distintos: ionização, dissolução de íons e adsorção de íons. A ionização consiste em um mecanismo de geração de íons a partir de moléculas e é dependente do pH do meio (TURKEVICH, J., *et al.*, 1951), como ocorre, por exemplo, com proteínas e anticorpos, os quais podem adquirir cargas positivas ou negativas, dependendo do valor de pH ao qual são submetidos. Por isso, a interação entre as

nanopartículas de ouro e os anticorpos fora realizada sob a influência de dois pHs distintos, 7 e 9.

A geração de íons por dissolução, por sua vez, não está representada no sistema proposto pela síntese com o citrato, uma vez que ela se refere às substâncias cujos íons que as constituem solubilizam-se diferentemente no solvente, culminando na apropriação, pelo íon insolúvel, da carga superficial do íon solúvel, através de forças originadas pela polaridade. Com isso, os íons solúveis são adsorvidos à porção insolúvel conferindo-lha carga de mesmo sinal (TURKEVICH, J., *et al.*, 1951). Já o mecanismo de adsorção de íons cabe a qualquer íon, tal qual um átomo que perdeu um elétron, atraído por uma superfície em virtude de forças eletrostáticas, que resulta na interação com os átomos da referida superfície (AGNIHOTRI, S., *et al.*, 2009). Nesse caso, o mecanismo é adequado para descrever o comportamento do sistema coloidal de nanopartículas de ouro ao considerarmos os mecanismos da cinética de crescimento das partículas discutidos no tópico sobre síntese de nanopartículas metálicas.

Os íons podem ser divididos em contra-íons, íons de carga oposta às partículas dispersas, e co-íons, íons de carga semelhante às partículas. Evidentemente, os contra-íons são atraídos pela superfície da partícula enquanto os co-íons são repelidos pela referida superfície. Tal organização, regida por atração e repulsão, dá origem a uma dupla camada elétrica, ainda que em condições de agitação térmica, responsável por configurar o sistema em dois meios: o meio polar e o meio disperso. A carga elétrica vinculada às partículas em tais sistemas coloidais, mensurada na eletroforese, é devida à existência dessa dupla camada de íons em sua superfície. Por conseguinte, a interação repulsiva entre as camadas de cargas iguais irá reger a presença ou a ausência de estabilidade dos colóides, na qual a distância entre as partículas e as forças de van der Waals apresentam forte influência, uma vez que podem ou não induzir choque entre as partículas dispersas podendo causar a agregação. Outro fator importante consiste na afinidade partícula-ligante, a qual culmina no aumento da estabilidade do sistema, muitos polímeros sintéticos e algumas proteínas são freqüentemente utilizados a fim de conferir estabilidade aos sistemas (RANGEL,R.N., 2006).

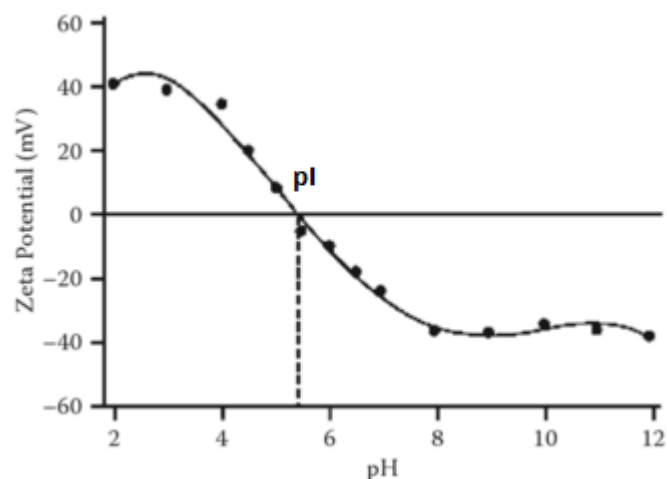
O valor encontrado para o potencial zeta das partículas sintetizadas foi de  $-24,18$  mV, o qual é indicativo de um grau de estabilidade moderado para o colóide uma vez que valores abaixo de  $\pm 10$  mV representam neutralidade e valores acima de  $\pm 30$  mV são indicativos de cargas bastante catiônicas ou aniônicas, cuja repulsão promove estabilidade. Lembrando que após sua síntese, o colóide de nanopartículas de ouro apresenta pH levemente ácido, em torno

de 5,5. Os potenciais zeta foram mensurados ainda em pH 7 e 9, ajustados com a adição de carbonato de sódio. As análises demonstraram valores discrepantes, a um pH de 7, o colóide produziu um potencial zeta de 105,7 mV, enquanto em pH 9, o valor foi igual a 0,75 mV (Tabela 5.1.3.1).

<b>Potencial Zeta</b>	<b>pH 6</b>	<b>pH 7</b>	<b>pH 9</b>
<b>Mobilidade (u/S/V/cm):</b>	-1,89	-8,26	0,060
<b>Potencial Zeta (mv):</b>	<b>-24,18</b>	<b>105,71</b>	<b>0,750</b>
<b>Carga (fC):</b>	-2311,00	13,00	10,00
<b>Condutividade (uS/cm):</b>	871	838	1

**Tabela 5.1.3.1.** Potencial Zeta do colóide de nanopartículas de ouro nos pHs 6, 7 e 9.

Essas três medições em função do pH não demonstram um comportamento típico previsto pelo comportamento geral crescente ou decrescente do potencial zeta frente às mudanças de pH (Figura 5.1.3.1) (LUO, M., *et al.*, 2012; MYHRA, S., *et al.*, 2012). É importante saber que o ponto isoelétrico é o ponto no qual o potencial zeta tem valor igual a zero, por isso, ele corresponde ao pH de maior instabilidade do colóide. Uma possibilidade é a de que tais valores de pH estejam em um dos dois pontos extremos possíveis, ou seja, nesses valores de pH o comportamento poderia estar fora de um comportamento linear, por isso, um estudo mais detalhado desse comportamento da carga eletrocinética das nanopartículas sintetizadas seria interessante para elucidar tal fato, contudo, não consistiria no foco deste trabalho e sim da continuidade dos estudos previstos para as nanopartículas de ouro de nosso grupo.



**Figura 5.1.3.1.** Gráfico típico de potencial zeta em função do pH. Nesse exemplo, o ponto isoelétrico (pI) do colóide era de 5,5 (extraído e adaptado de MYHRA(2012), p.151).

#### 5.1.4. Espectrometria no Infravermelho

A radiação infravermelha (IR) abrange a parte do espectro localizada entre o espectro visível e as micro-ondas, entretanto, no que tange aos compostos orgânicos, o intervalo de maior utilidade situa-se entre  $4.000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ . Nesta faixa, a radiação infravermelha ao ser absorvida por uma molécula orgânica converte-se em energia de vibração molecular e cada alteração de nível de energia vibracional é acompanhada de uma série de alterações de nível de energia rotacional. Sendo assim, o conjunto das bandas produzidas no IR a partir de compostos orgânicos e a uma determinada faixa do espectro ( $10.000\text{ cm}^{-1}$  a  $100\text{ cm}^{-1}$ ) é formado por alterações no dipolo de ligação. Essas bandas de absorção terão suas frequências e comprimentos de ondas correspondentes dependentes das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e também da geometria dos átomos. A posição de uma banda de absorção no espectro IR é apresentada em número de ondas, cuja unidade, o centímetro inverso ( $\text{cm}^{-1}$ ), é proporcional à energia de vibração e a intensidade da banda é expressa tanto por transmitância (T), que é a razão entre a energia transmitida pela amostra e a energia incidente, quanto por absorbância (A), determinada pelo logaritmo decimal do inverso da transmitância (SILVERSTEIN, R., *et al.*, 2007).

Para análise preliminar de um espectro infravermelho produzido por uma substância priorizam-se as áreas de  $4000$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  e de  $900$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ , sendo que a região de maior

frequência indica a presença de grupos funcionais importantes, tais como OH, NH e C=O. A ausência de grupos funcionais entre 1850 e 1540 elimina a presença de carbonilas e a presença de bandas fortes na região entre 1600 e 1300 caracterizam a presença de compostos aromáticos ou heteoaromáticos (SILVERSTEIN, R., *et al.*, 2007).

Dessa forma, ao analisar os espectros de infravermelho produzidos pelo citrato de sódio e pelas nanopartículas de ouro é evidente a presença dos grupos funcionais OH e C=O em ambos. No entanto, após o processo de síntese, alterações significativas nessas bandas também são percebidas. Tal resultado é esperado, uma vez que na síntese de nanopartículas, as moléculas de citrato são convertidas em moléculas de dicarboxicetano, formam complexos com os íons metálicos reduzindo-os e, conseqüentemente, oxidando-se. Assim, espera-se encontrar alterações no número de onda de carbonilas e de hidroxilas. Uma vez que a temperatura de decomposição do citrato de sódico tribásico é igual a 150°C, não é esperado que o efeito da temperatura de síntese possa ter influência sobre a variação entre os espectros, haja vista a temperatura de 100°C empregada na execução da síntese. .

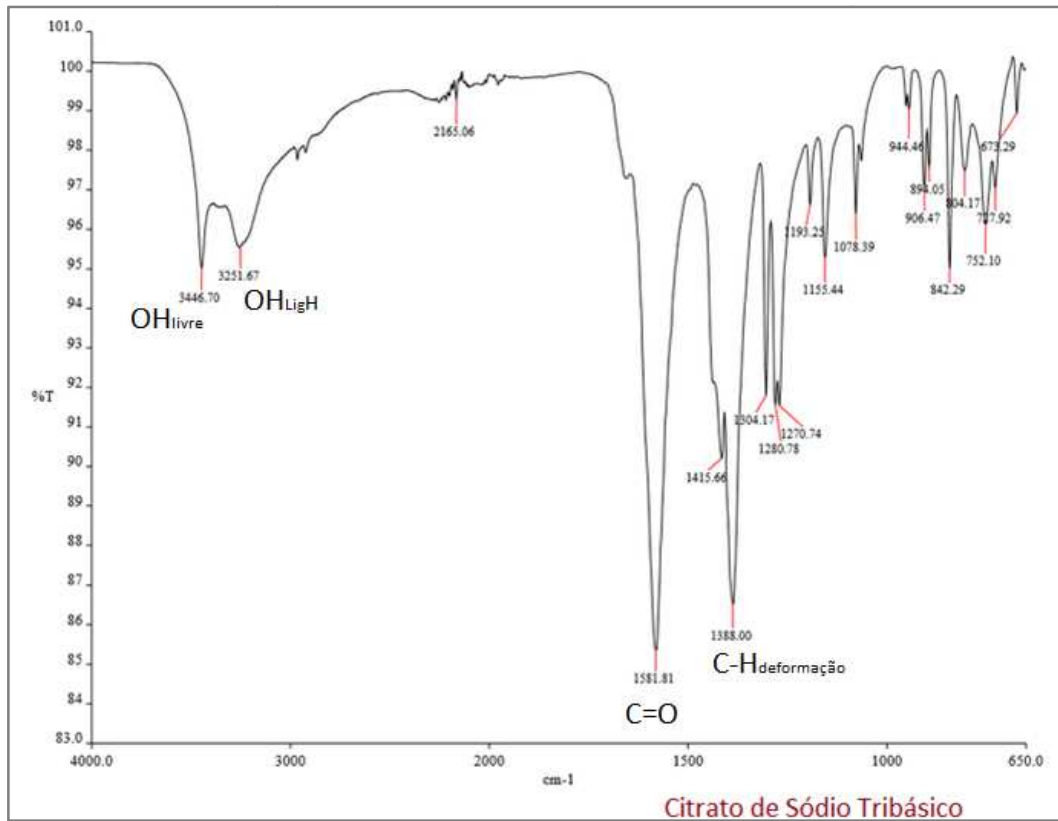
Na identificação molecular estrutural são analisadas, principalmente, as vibrações acopladas axiais e angulares, as quais apresentam um átomo ou ligação compartilhada por um ou mais grupos químicos de frequências de absorção próximas, capazes, por tanto, de influenciar na posição da respectiva banda no espectro. Dessa forma, tem-se, por exemplo, uma significativa diferença entre bandas de absorção geradas por carbonilas quando estas são provenientes do dióxido de carbono e as produzidas por cetonas alifáticas. Observa-se que no dióxido de carbono, devido ao forte acoplamento existente entre as vibrações das carbonilas, a absorção produzida ocorre em comprimentos de onda menores e, portanto, frequências maiores que as percebidas para cetonas alifáticas, as quais aparecem na mesma posição das carbonilas convencionais, aquelas separadas por um ou mais carbonos. Isso também ocorre com ligações C-H entre compostos aromáticos e alifáticos (BERTOLI, A., *et al.*, 2015; SILVERSTEIN, R., *et al.*, 2007).

À vista disso, a identificação da conversão do citrato em dicarboxicetona torna-se difícil, haja vista a proximidade das vibrações provocadas pelas duas carbonilas, a coexistência dos dois grupos no material e a proximidade das diferentes carbonilas na molécula, levando, por tanto, à evidente sobreposição de bandas no entorno de 1600 cm<sup>-1</sup> (Figuras 5.1.4.1 e 5.1.4.2). Contudo, ainda que discreto, o deslocamento da banda C=O para números de onda pouco menores pode ser um indício do aumento da razão carbonilas

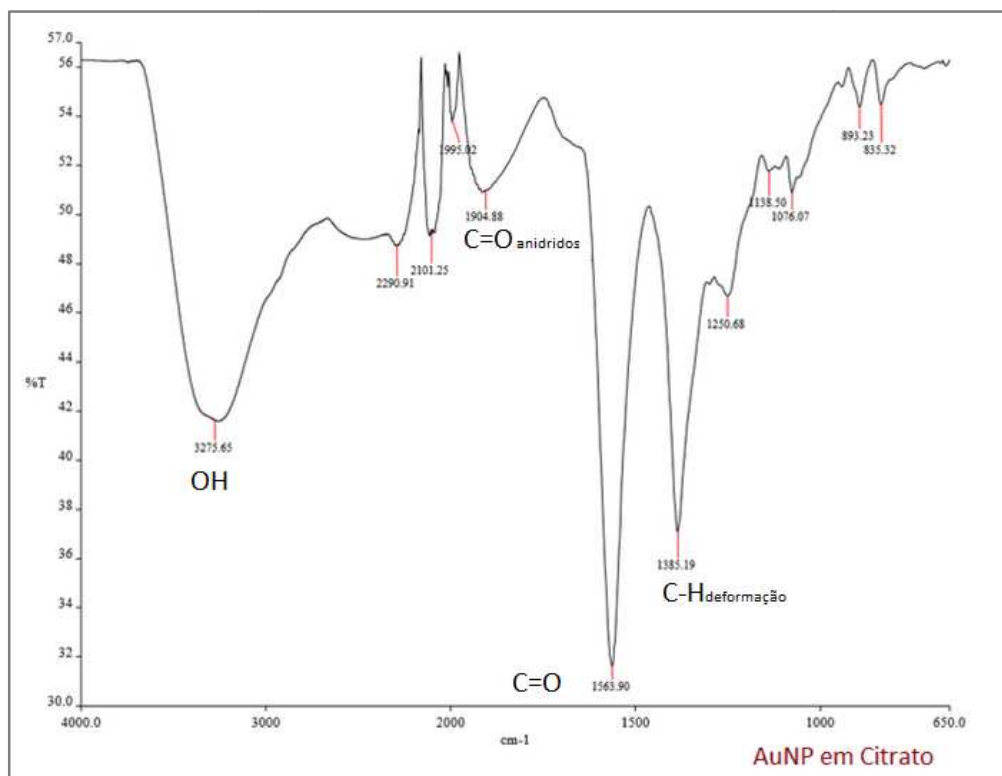
cetônicas/carbonilas de carboxilas. O aparecimento de bandas no entorno de  $1900\text{ cm}^{-1}$  no espectro de nanopartículas é indicativo de carbonilas constituintes de anidridos formados pela desidratação de ácidos. A banda referente às vibrações de hidroxilas aumentou significativamente no espectro pós-síntese e uma inegável sobreposição foi observada, tal alargamento relaciona-se com extensas ligações de hidrogênio acopladas ou com a formação de complexos metálicos ( $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ ). Uma banda característica do espectro que envolve formação de complexos metálicos a partir de ácidos carboxílicos provém da deformação angular do grupo O-H em ligação de hidrogênio. Identifica-se, por fim, que as alterações, tanto através de deslocamentos de bandas quanto por meio de intensidades relativas, apresentaram-se quase exclusivamente na região das ligações C=O e O-H, inferindo, mais do que uma conversão de citrato em dicarboxicetona, mas também, a possível interação desses grupos com a superfície metálica (BALACHANDRAN, V. *et al*, 2014; BERTOLI, A.C. *et al*, 2015; SILVERSTEIN, R.M., *et al*. 2007).

O infravermelho consiste em uma radiação de menor energia e sua principal aplicabilidade é verificar as características dos estiramentos e das deformações provocadas pela radiação em uma determinada substância química. Por isso, ainda que tenha sido possível observar características de formação de complexos metálicos com ligações C=O de ácidos carboxílicos ou de cetonas, estes apresentaram as características de todo o ambiente no qual as nanopartículas estavam inseridas. Portanto, a real característica de coordenação química sobre as nanopartículas não pode ser desvendada apenas pelo infravermelho, fato este que motivou a utilização da espectroscopia Raman.





**Figura 5.1.4.1** Espectro infravermelho (FT-IR) do citrato de sódio tribásico sólido.



**Figura 5.1.4.2** Espectro infravermelho (FT-IR) de nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio.

### 5.1.5. Caracterização das AuNPs pela Espectroscopia Raman

O efeito Raman, descoberto em 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman, consiste em um efeito observado quando uma luz monocromática é incidida sobre átomos e moléculas e, ao ser espalhada, apresenta-se não apenas com a mesma frequência da luz incidente, mas também em frequências distintas. Na abordagem quantomecânica, o choque entre um quantum de luz e uma molécula origina, além de uma dispersão elástica (*Rayleigh*), na qual o fóton conserva a sua energia, também uma dispersão inelástica, na qual há permuta de energia. Nela, o fóton cede energia para a molécula (Stokes) ou recebe energia da molécula (anti-Stokes). As diferenças de energia são medidas em número de onda e correspondem às energias de vibração (apenas Stokes) e de rotação (Stokes e anti-Stokes) das moléculas dispersantes. Dessa forma, as diferenças de número de onda são características das moléculas irradiadas e são utilizadas para extrair informações químicas e estruturais de uma substância (WEDLER, G., 2001).

A Espectroscopia Raman original não é uma técnica analítica sensível quando comparada com outras espectroscopias como as de emissão ou absorção. Isso se deve ao fato de que a eficiência com que as moléculas espalham radiação, ou a probabilidade de elas espalharem radiação, em cada comprimento de onda é significativamente menor do que a de emitir ou absorver o fóton incidente (LASERNA, J. J., *et al.* 1993). Contudo, o potencial da espectroscopia Raman como ferramenta analítica pode ser intensificado. Essa forma consiste em usar o laser para excitar moléculas adsorvidas sobre um substrato metálico ou muito próximas a uma superfície metálica, em virtude do surgimento de um efeito denominado Intensificação de Espalhamento Raman por meio de Superfície, muito referenciado no idioma inglês pelo nome de “*Surface-Enhanced Raman Scattering*”, ou SERS. Existe mais de uma teoria para justificar esse efeito, entretanto, a mais aceita consiste, basicamente, na intensificação do campo elétrico da radiação emitida pelo metal quando este é irradiado por uma onda eletromagnética. Isso se deve aos elétrons de condução do metal, que ao interagirem com a radiação incidente, produzem um campo elétrico correspondente ao produto entre o campo elétrico da superfície metálica e o campo elétrico do laser incidido. A

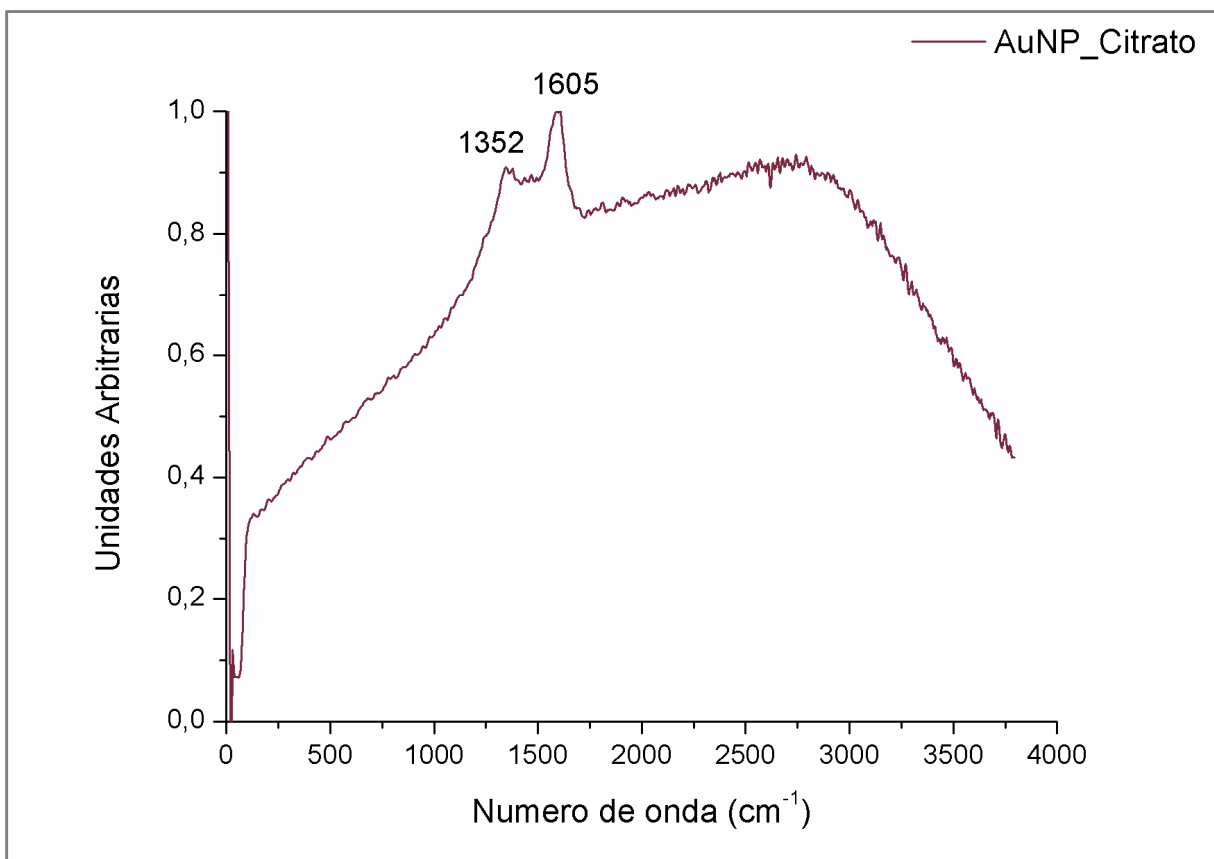
radiação emitida, por sua vez, excita as moléculas adsorvidas ou próximas ao metal, como resultado, o espalhamento Raman produzido pela molécula é fortemente intensificado ao ser detectado por um espectrômetro Raman (MOSKOVITS, M., *et al.*, 2005). Com isso, a eficiência de espalhamento da luz é aumentada em ordens de magnitude acima de  $10^6$ . Esse fenômeno foi descoberto pelo químico tcheco Martin Fleischmann, na universidade britânica de Southampton, a partir de um estudo eletroquímico da piridina adsorvida em um eletrodo de prata realizado no ano de 1974 (FLEISCHMANN, M., 1974).

Neste trabalho, o espectro Raman produzido pelo colóide demonstrou intensos modos de estiramento com números de onda próximos a  $1352\text{ cm}^{-1}$  e  $1605\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem aos estiramentos dos carboxilatos provenientes dos grupos carboxílicos do citrato e da dicarboxicetona. (Figura 5.1.5). Sabe-se que parte do citrato é convertido em dicarboxicetona formando complexos com as nanopartículas de ouro e conferindo-lhas estabilidade. O espalhamento próximo a  $1350\text{ cm}^{-1}$  é indicativo de estiramentos simétricos do carboxilato, enquanto o modo em  $1605\text{ cm}^{-1}$  é representativo de estiramentos assimétricos de um carboxilato, também observados por MUNRO *et al.* (1995). Outra informação pode ser obtida a partir da distância entre os modos de estiramentos simétricos e assimétricos, a qual foi de, aproximadamente,  $250\text{ cm}^{-1}$ . Essa distância indica que os carboxilatos envolvidos formam complexos monodentados com o metal. Uma banda larga também pode ser observada nos números de onda próximos a  $3000\text{ cm}^{-1}$ , tal evento é característico da energia fototérmica convertida pelas partículas irradiadas, isto é, as AuNPs ao absorverem a luz incidente, re-emitem a energia na forma de calor através da sua superfície e da conexão com outras partículas (MUNRO, C. H. *et al.*, 1995).

O espectro Raman obtido apresentou alta intensidade para as moléculas irradiadas, uma vez que as moléculas do complexo estabilizador foram excitadas pelo campo elétrico intensificado da radiação emitida pela superfície metálica, dessa forma, é possível conferir quais as estruturas estão diretamente conectadas às partículas, confirmando a estabilização por grupos carboxílicos. Diferentemente do espectro infravermelho, o espectro Raman, reforçado pelo efeito SERS proporcionado pelas nanopartículas de ouro, pode identificar o grupo químico estabilizador sem captar os demais grupos presentes no meio.

A se saber, o efeito SERS pode apresentar eficiência ainda maior quando combinado com um efeito de ressonância óptica das moléculas. Ou seja, um segundo efeito pode observado quando o comprimento de onda de excitação é ressonante com a frequência

vibracional molecular. Neste caso, há reforço adicional do sinal SERS, produzindo um fenômeno conhecido pelo nome de Espalhamento Raman Ressonante Intensificado por meio de Superfície (SERRS) (MCNAY, G., *et al.*,2011). Entretanto, o SERRS não se aplica ao sistema proposto.



**Figura 5.1.5.** Espectro Raman (SERS) de nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sodio.

## 5.2. Interação das Nanopartículas com Anticorpos

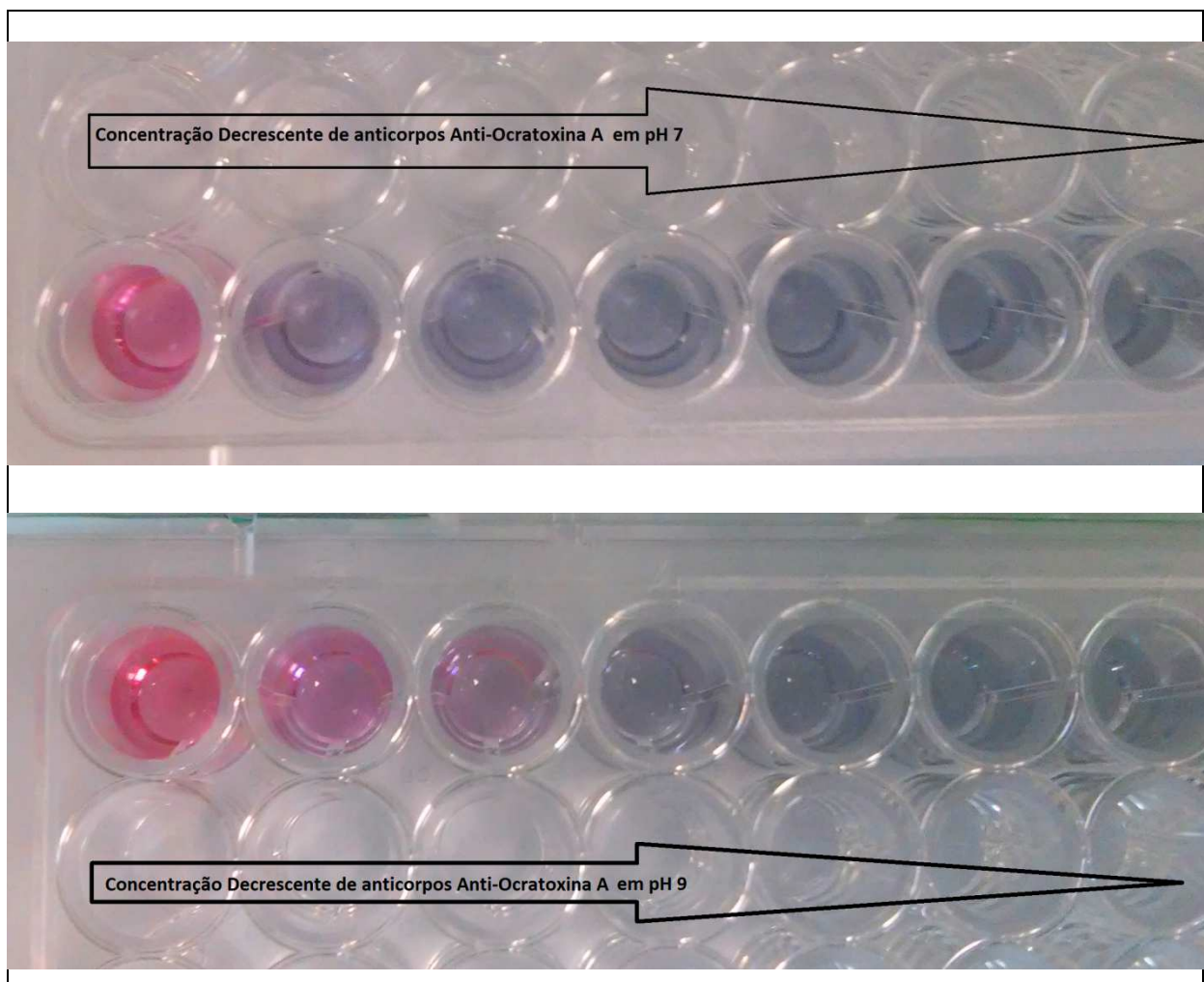
A interação entre os anticorpos Anti-Ocratoxina A e as nanopartículas de ouro baseou-se na estratégia de adsorção física, a qual pode ser baseada em interações hidrofóbicas, eletrostáticas, forças de van der Waals ou ligações de hidrogênio (MONTENEGRO, J.M., *et al.*, 2013). Aqui, priorizou-se a interação eletrostática uma vez que o fator introduzido para avaliar a eficiência da interação AuNP-Anticorpos foi o valor de pH. Para isso, realizou-se um teste cujo princípio consiste na capacidade do ligante em inibir a agregação das AuNPs quando estas são submetidas a uma concentração de NaCl de 1,55M, responsável por desestabilizar o colóide e provocar agregação imediata. Como o valor de pH do ponto

isoeletrico (pI) típico de anticorpos do tipo IgG situa-se em torno de 8,7, utilizou-se um colóide em pH 7 e outro em pH 9 para que se pudesse avaliar a carga do anticorpo de melhor interação com a carga da partícula, isto é, a carga favorável para a adsorção iônica. Os anticorpos submetidos a valores de pH acima do pI apresentam-se negativamente carregados, enquanto os anticorpos abaixo, apresentam-se positivamente carregados (KHAWLI, L. A , *et al.* 2010; MONTENEGRO, J.M., *et al.*, 2013).

Uma vez que a atração eletrostática é governada pela interação entre as cargas superficiais das nanopartículas e dos anticorpos, o pH da solução irá governar a atração ou a repulsão entre eles. O ponto isoeletrico de uma proteína é o pH no qual a carga líquida da referida proteína é igual a zero e, numericamente, o pI corresponde à média entre os valores de pH nos quais os grupos ionizáveis da proteína apresentam-se 50% ionizados (pK1 e pK2). Os valores de pH abaixo do ponto isoeletrico apresentam anticorpos positivamente carregados e os valores de pH acima do pI., negativamente carregados (MONTENEGRO, J.M., *et al.*, 2013). Sabe-se que o potencial isoeletrico típico de anticorpos IgG situa-se entre 8,7 e 8,9 (KHAWLI, L.A., 2010) determinou-se a utilização dos valores de pH 7 e 9 para avaliação da eficiência de estabilização. O pH responsável pela maior eficiência de estabilização foi o pH 9, o qual inibiu a agregação com uma concentração de anticorpos inferior à necessária para estabilização em pH 7 (Figura 5.2.1). Lembrando que, nesse pH os anticorpos apresentavam-se com carga líquida negativa maior enquanto o a carag electrocinética da partícula (potencial zeta) apresentava-se com um valor positivo próximo a zero, 0,75mV. O pH 7, por sua vez, deve apresentar os anticorpos com carga líquida positiva, haja vista o pI teórico ser 8,7, enquanto o potencial zeta apresentou-se substancialmente positivo, 105,7 mV.

Com isso, em termos de atração eletrostática e de adsorção iônica, os valores encontrados em pH 9 propiciaram que este fosse o pH no qual o colóide estabilizou-se mais eficientemente após a adição dos anticorpos, sendo, por tanto, compatível com o resultado da figura 5.6. Nela, é possível perceber que em pH 7 apenas a maior concentração de anticorpo, representada pela cor preservada no primeiro poço da fileira, foi capaz de proteger a dispersão da desestabilização por adição de eletrólitos. É possível inferir que a carga positiva da camada superficial de íons da partícula não possibilitou a adsorção iônica do anticorpo na superfície. Em contrapartida, o pH 9 demonstrou três poços cuja coloração característica do colóide em condições estáveis foi preservada. Ou seja, a concentração de anticorpo diluída em até 1:4 conseguiu inibir a agregação generalizada das nanopartículas. Infere-se por tanto, que a carga

eletrocinética positiva próxima de zero possibilitou a aproximação dos anticorpos de carga líquida negativa para a superfície da partícula, assim isso, um processo de adsorção iônica é possível de ter acontecido. Da mesma forma, Anfossi, L. *et al* (2012), ressaltou a incompatibilidade de pH levemente ácidos na conjugação de AuNP com nanopartículas de ouro, utilizando em seu estudo um pH 8,5 para esse fim e um meio de pH 9 para realização do ensaio.



**Figura 5.2.1** Nanopartículas de ouro com concentrações decrescentes de anticorpo Anti-Ocratoxina A após a adição de NaCl na concentração de 1,55M. A cor cinza representa a agregação das nanopartículas e a coloração rosa representa estabilidade frente à adição de NaCl.

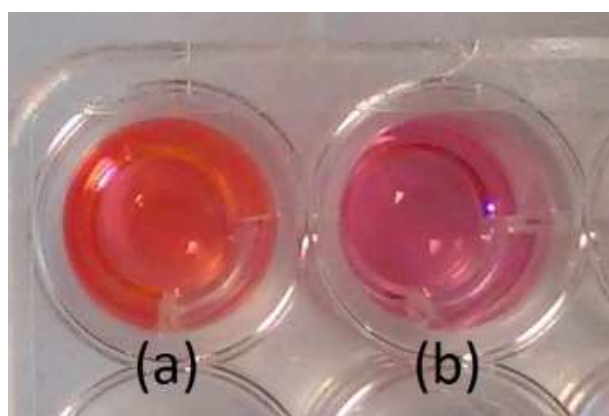
Este teste realizado não possibilita não somente a obtenção do pH ideal para a estabilização do colóide por anticorpos, ele determina também a concentração ideal de anticorpos para atingir tal estabilidade no pH ideal. Essa concentração é inferida com base na

coloração observada e a determinação é procedida da seguinte forma: após a adição do citrato, deve-se identificar quais poços mantiveram os colóides com a coloração intacta. Ainda na figura 5.2.1, observa-se que os três primeiros poços não se tornaram cinza, entretanto, o segundo e terceiro poço apresentam-se com coloração intermediária entre o estado agregado e o não agregado, ou seja, estão parcialmente agregados, já o primeiro poço permaneceu com a coloração intacta, sendo, assim, a concentração ideal de anticorpo. Sendo a concentração do primeiro poço  $25\mu\text{g.mL}^{-1}$  de anticorpo Anti-Ocratoxina A em  $100\mu\text{L}$  de colóide, essa é, portanto, a concentração ideal a ser utilizada nos testes subsequentes. Esse teste é conhecido pelo nome de *Gold Number* e é muito seguro e simples. A importância de determinar a concentração ideal justifica-se não somente pela economia de anticorpos, mas, principalmente, para evitar que o excesso de proteína provoque a formação de grumos e desestabilize a dispersão.

Outro aspecto capaz de evidenciar a interação entre as nanopartículas e o anticorpo é a coloração do colóide após a adição dos anticorpos, cuja percepção pode ser visual, mas a mensuração de ser pelo espectro de absorção no Uv-Visível. Por tanto, conforme se observa na figura 5.2.2, o poço contendo o colóide original apresenta-se com tonalidade distinta do colóide no qual os anticorpos foram adicionados. A mudança na tonalidade ocorre de maneira abrupta e instantânea e é representativa de uma perturbação do efeito plasmônico da superfície, evidenciando a interação com os anticorpos. Essa nova tonalidade pôde ser mensurada através da comparação entre os espectros das nanopartículas antes e após adição dos anticorpos Anti-Ocratoxina A na figura 5.2.3-a. Nela, observa-se o deslocamento do pico máximo de absorção em 8 nm para a direita, isto é, deslocou-se entre 520 nm e 528 nm. Além disso, a intensidade de absorção da luz produzida pelo efeito plasmônico reduziu significativamente evidenciando a proximidade entre a superfície metálica e os anticorpos introduzidos no sistema. Esse decréscimo foi de 18%, o qual migrou de 0,446 A para 0,369 A ou de 1 para 0,826 unidades arbitrárias. Adsorção de anticorpos na superfície metálica é comumente acompanhada de perturbação da ressonância dos plasmons de superfície uma vez que o recobrimento da nanopartícula com qualquer tipo de material dielétrico conduz a mudanças no índice de refração, na frequência da LSPR e na amplitude da absorção (WHU, C., 2009; FREDERIX, F. 2003)

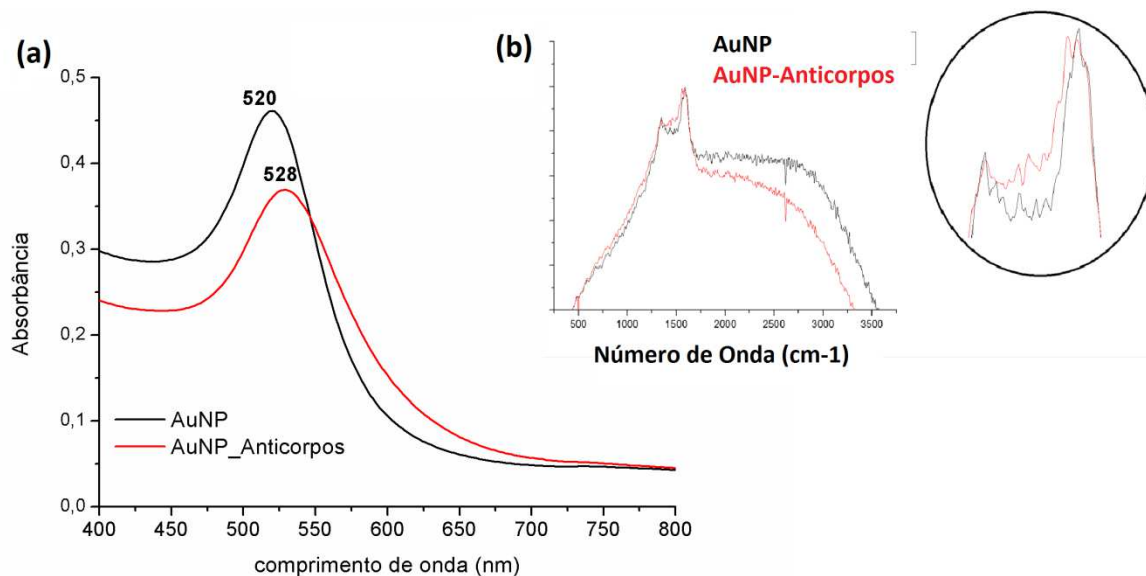
Os íons provenientes da molécula de citrato formam a primeira esfera de coordenação ao redor da nanopartícula conferindo-lha estabilidade. Muitas moléculas orgânicas, tais como

as proteínas, também são ricas em carbonilas e hidroxilas, dessa forma, são pouco competitivas frente ao citrato. Conforme foi descrito, os anticorpos e as proteínas, na ausência de ligantes específicos, comumente interagem eletrostaticamente com a camada elétrica no entorno da partícula. A técnica de espectroscopia Raman é ideal para identificar os compostos conectados ou muito próximos à nanopartícula metálica. Por isso, utilizou-se a dispersão coloidal adicionada de anticorpos Anti-Ocratoxina A para análise do espalhamento Raman (Figura 5.2.3-b). Pelo espectro obtido é possível observar que o anticorpo não desloca a coordenação dos íons provenientes do citrato, mas pode formar uma segunda esfera de coordenação, haja vista a pouca diferença entre os dois espectros. Observa-se apenas um decréscimo da intensidade de espalhamento que abrange a porção mais à direita do espectro que pode estar relacionada ao aumento de matéria orgânica entre as partículas, diminuindo a eficiência de re-irradiação entre elas.



**Figura 5.2.2.** Fotografia da dispersão coloidal de nanopartículas de ouro antes (a) e após (b) a adição dos anticorpos Anti-Ocratoxina A. Enquanto o colóide original apresenta-se vermelho, o colóide com nanopartículas possui coloração rosa.





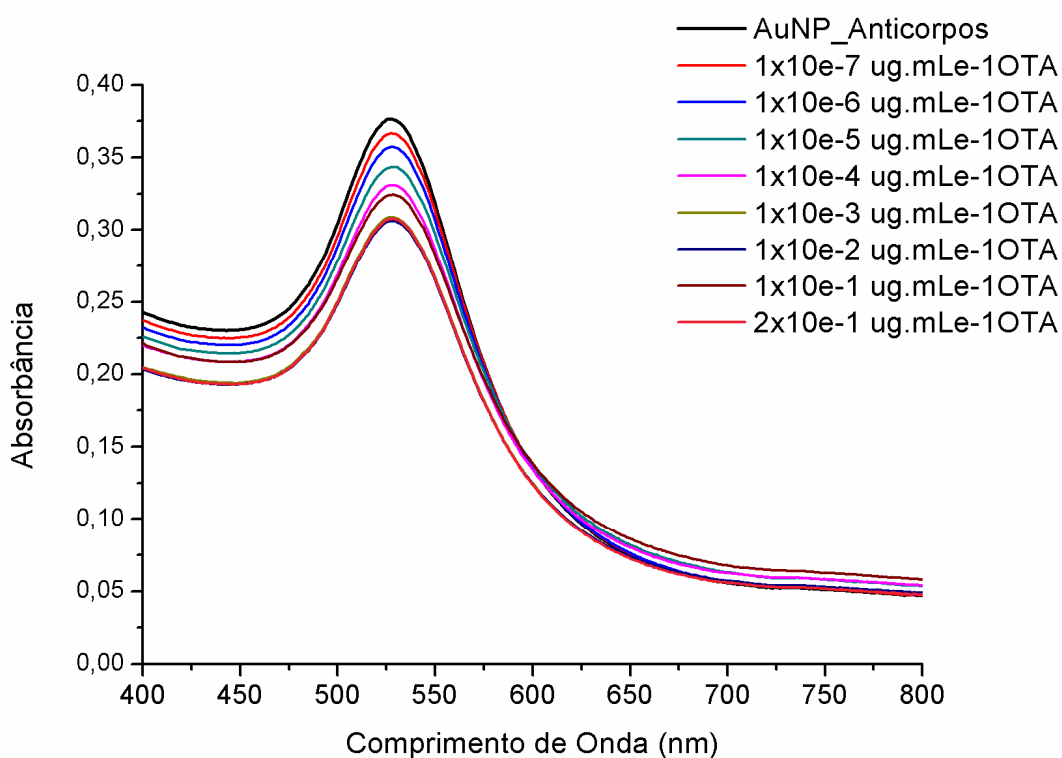
**Figura 5.2.3. (a)** Espectros de absorção da dispersão coloidal de nanopartículas de ouro antes e após a adição de anticorpos Anti-Ocratoxina A. **(b)** Espectros de espalhamento Raman de nanopartículas sintetizadas com citrato na presença e na ausência de anticorpos.

### 5.3. Detecção de Ocratoxina A

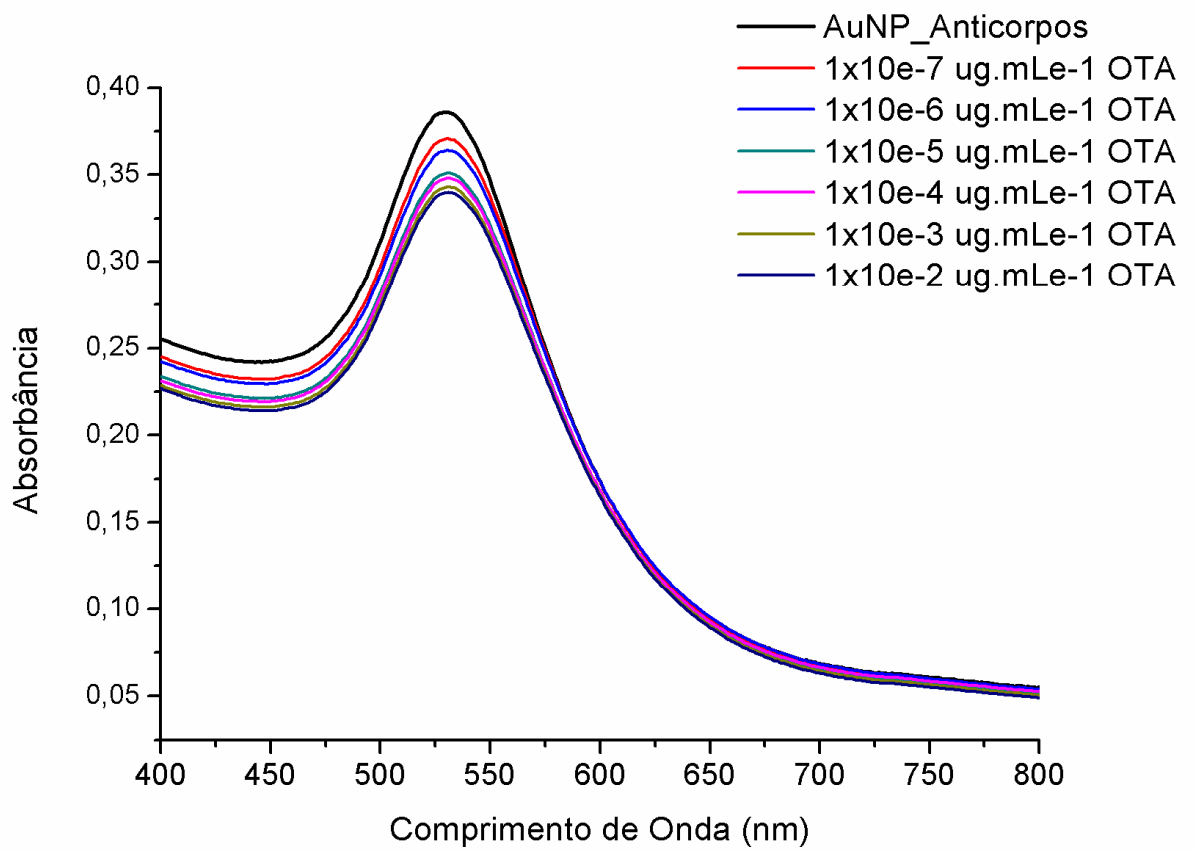
O teste de detecção de Ocratoxina A foi realizado através da adição de concentrações crescentes de Ocratoxina A na dispersão coloidal de nanopartículas de ouro, as quais haviam sido submetidas à adição de anticorpos Anti-Ocratoxina A em pH 9. Cada espectro foi realizado 2 minutos após cada adição de ocratoxina A e levemente agitado. As concentrações de toxina utilizadas foram  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$  e  $2 \cdot 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os espectros de absorção obtidos demonstraram que o aumento da concentração de toxina foi acompanhado da diminuição da intensidade de absorção da luz pelo colóide até a concentração de  $1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g.mL}^{-1}$  e, a partir dessa concentração, os gráficos se sobrepõem não dando continuidade à perda de intensidade (Figura 5.3.1). Tendo em vista a dificuldade de visualizar tal efeito apenas pela comparação dos espectros identificados por cores, os valores de absorbância no comprimento de onda de 528 nm foram reunidos em um gráfico em função da concentração de Ocratoxina A (Figura 5.3.3). A partir dele é possível visualizar com clareza a diminuição de intensidade de absorção frente à adição de toxina.

Subsequentemente, o mesmo teste foi realizado, exceto pelo fato de a concentração mais alta de OTA testada ter sido  $1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g.mL}^{-1}$  (0,001 ppm) cuja massa molar é igual

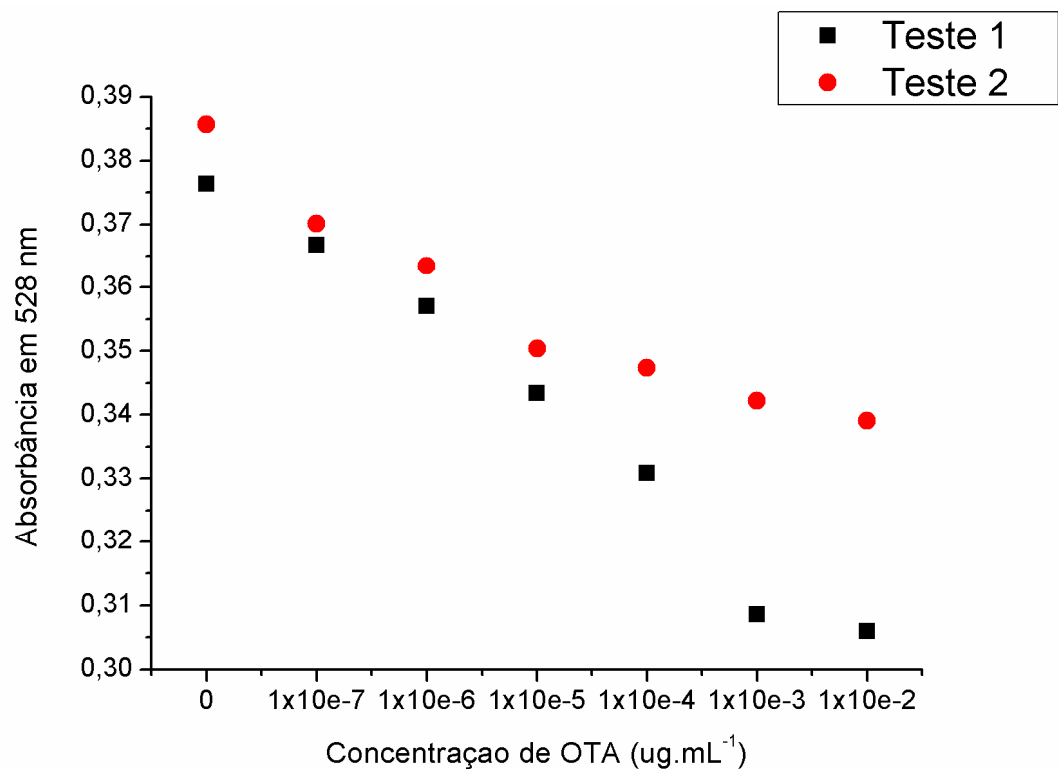
$24,8 \cdot 10^{-9}$ . Neste segundo momento, os espectros produzidos demonstraram a mesma relação inversa entre concentração de toxina e absorbância máxima até a concentração de  $1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , bem como no primeiro ensaio (Figura 5.3.2). Da mesma forma, as absorbâncias foram, então, colocadas na forma de gráfico, em função da concentração, para melhor visualização do efeito (Figura 5.3.3). Os dois testes, ao serem comparados através da relação entre a absorbância máxima (528 nm) e a concentração de toxina crescente, demonstraram um comportamento semelhante entre as medidas dos ensaios até a concentração de  $1 \cdot 10^{-2}$  e, a partir dela, o distanciamento entre os pontos tornou-se evidente. Infere-se, portanto, que nesses níveis de concentração o sistema tem mostrado indícios de saturação.



**Figura 5.3.1** Espectros de absorção do colóide de nanopartículas de ouro, conjugadas com anticorpos Anti-Ocratoxina A, antes e após a adição de concentrações crescentes de Ocratoxina A, abrangendo o intervalo entre  $1 \times 10^{-7}$  e  $2 \times 10^{-1} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

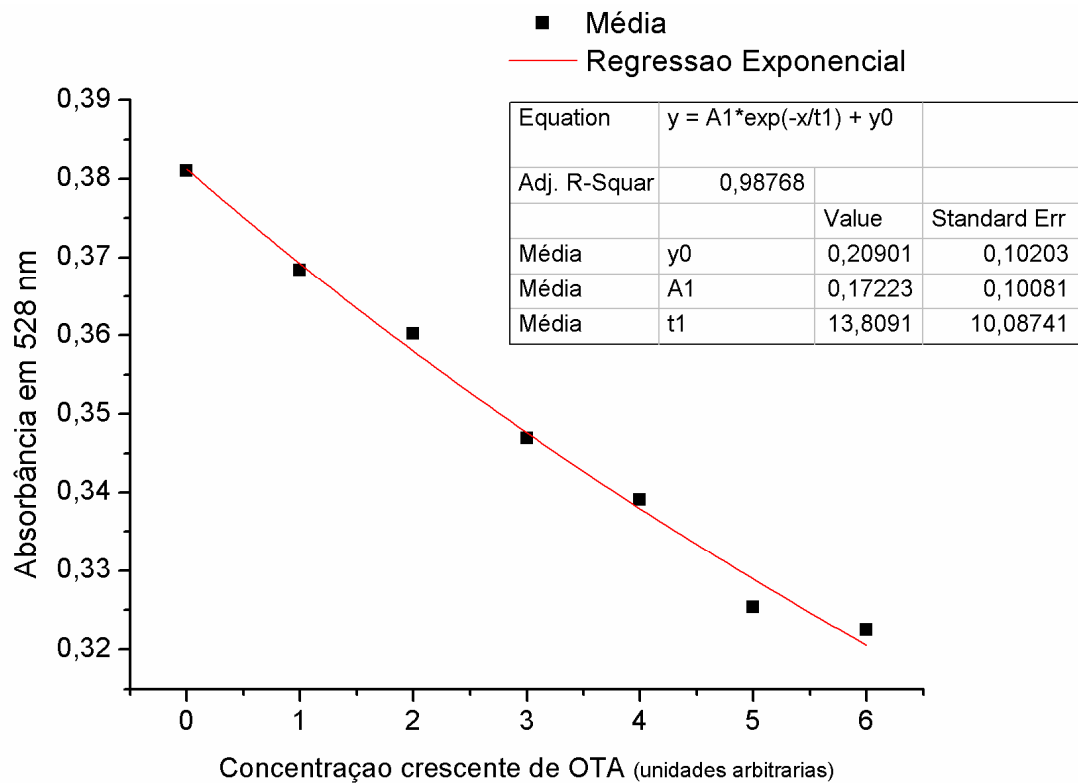


**Figura 5.3.2.** Espectros de absorção do colóide de nanopartículas de ouro, conjugadas com anticorpos Anti-Ocratoxina A, antes e após adição de Ocratoxina A, abrangendo o intervalo entre  $1 \times 10^{-7}$  e  $1 \times 10^{-2} \mu\text{g.mL}^{-1}$ .



**Figura 5.3.3.** Absorbâncias em 528 nm de nanopartículas de ouro submetidas a concentrações crescentes de Ocratoxina A realizadas em duplicata.

Na figura 5.3.4, estão expostas as absorções obtidas no comprimento de onda de 528 nm de todas as concentrações de Ocratoxina A testadas. Os valores apresentados referem-se aos pontos médios obtidos a partir dos dois testes distintos e consecutivos. Após a tabulação dos dados e a estimação de uma função de regressão exponencial para o modelo, a qual melhor se ajustou aos valores observados, foi possível observar que, para os ensaios realizados, a mudança na intensidade do pico de absorção correlaciona-se diretamente com a adição de alíquotas com concentrações crescentes de Ocratoxina A. A menor concentração detectada foi de  $1 \cdot 10^{-7}$  ug.mL<sup>-1</sup>, ou seja, 0,1pg.mL<sup>-1</sup> (100 ppt).



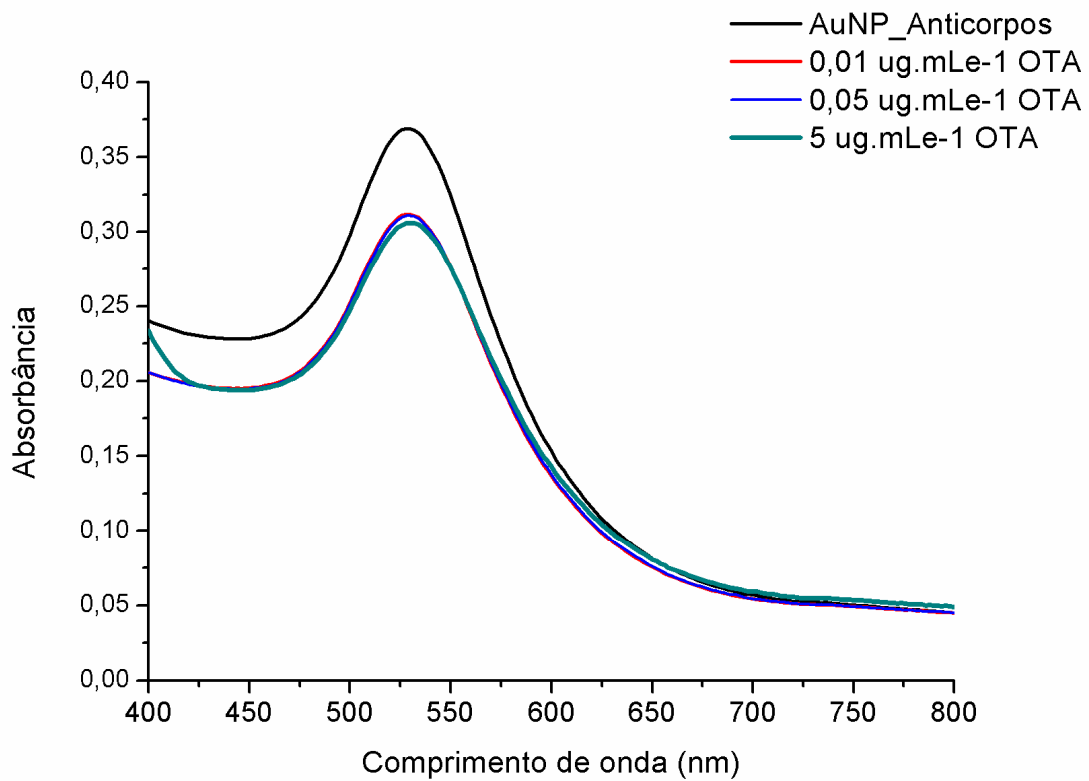
**Figura 5.3.4.** Médias das absorbâncias no comprimento de onda de 528 nm dos testes com concentrações crescentes de Ocratoxina A realizadas em duplicata.

Em virtude da perda progressiva de linearidade observada nas concentrações muito elevadas, realizou-se um terceiro ensaio para confirmar uma possível condição de saturação, cuja primeira concentração testada foi de  $1 \times 10^{-2} \mu\text{g.mL}^{-1}$  de OTA. Após a obtenção e comparação dos espectros (Figura 5.3.5), confirmou-se a condição de saturação, observou-se também, que a alta concentração de OTA adicionada, logo na primeira alíquota, acarretou em uma perda de absorbância foi substancialmente maior do que a perda de absorbância observada na adição da primeira alíquota de menor concentração dos ensaios anteriores. Ao adicionar a Ocratoxina A, a absorbância decresce em 15,5%, isso significa ir de 0,369 para 0,311 de absorbância ou de 1 para 0,845 de unidades arbitrárias normalizadas. Tal decréscimo foi extremamente próximo ao observado para a média das absorbância dos ensaios anteriores (Figura 5.3.4) , que para a mesma concentração de OTA ( $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou um decréscimo de 15,4%, indo de 0,381 A para 0,322 A ou de 1 para 0,846. Tais observações mostram um cenário promissor, haja vista ter reproduzido o decréscimo de absorbância percebido, para a mesma concentração de analito, sob condições diferentes.

É possível avaliar se as concentrações altas de toxina correspondem a um ponto de saturação teórico através da utilização do cálculo do número de moléculas de anticorpos, de moléculas de Ocratoxina A e de nanopartículas de ouro. A massa do anticorpo por molécula consiste em uma estimativa utilizada teoricamente, por isso, os resultados serão sempre aproximados, e não exatos. Um anticorpo IgG pesa, em média, 150 kDa (JANEWAY, C.H. 2005), o que corresponde a  $2,49081 \cdot 10^{-13}$   $\mu$ g. Ao adicionar os anticorpos em 100  $\mu$ L de dispersão de AuNPs, utiliza-se 2,5  $\mu$ g de anticorpos. Logo, se dividirmos 2,5  $\mu$ g por  $2,49081 \cdot 10^{-13}$   $\mu$ g, obteremos o número de anticorpos de Anti-Ocratoxina A, cuja quantidade consiste em  $1,0036896 \cdot 10^{13}$  anticorpos. A massa molar da Ocratoxina A é 403, 813  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , ou seja, 403,813 g para  $6,022 \cdot 10^{23}$  moléculas. A partir daí, pode-se calcular a massa de cada molécula, a qual é igual  $6,70563 \cdot 10^{-22}$ g. Dividindo-se a massa de OTA na concentração na qual houve saturação total do sistema,  $1,0 \cdot 10^{-1}$   $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , pela massa de cada molécula,  $6,70563 \cdot 10^{-22}$ , obter-se-á o número de moléculas por mL de solução, cujo valor é  $1,4913 \cdot 10^{13}$  moléculas de Ocratoxina A. Como o volume de dispersão era de 100  $\mu$ L, o número de moléculas no colóide no qual se realizou o ensaio foi de  $1,49 \cdot 10^{13}$  moléculas, ou seja, havia no sistema um número maior de moléculas de Ocratoxina A, de forma que todos os anticorpos poderiam estar ocupados por uma molécula e 50 % deles com duas moléculas. Dessa forma, pode-se concluir que a perda da eficiência de detecção foi causada pela condição de saturação do sistema. No entanto, na concentração de  $1 \cdot 10^{-2}$  já pôde ser observado o início de um platô, que ao atingir  $1 \cdot 10^{-1}$  saturou-se perdendo completamente a capacidade de detecção de concentrações superiores.

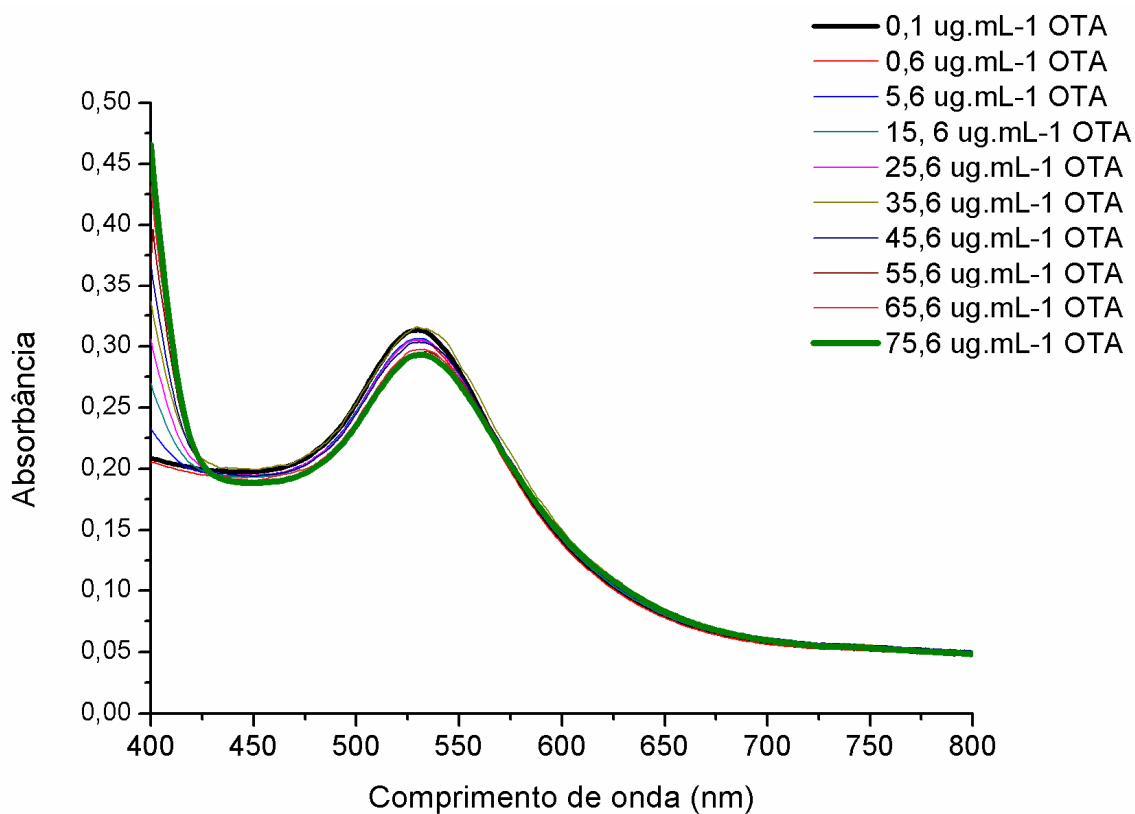
Uma observação, que pode parecer um detalhe, mas é ainda mais interessante, consiste na descida abrupta de absorvância no comprimento de onda entre 400 e 425 nm relativos à concentração de 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , evidenciada em verde na mesma figura (Figura 5.3.5). Considerando que, conforme citado previamente, a região de 400 nm é característica por extinguir a luz devido ao processo de espalhamento, o qual é diretamente relacionado ao tamanho da partícula, é possível inferir que a molécula de toxina, possivelmente, coordenou a partícula, juntamente com os anticorpos adsorvidos, sendo responsável pelo aumento aparente do diâmetro da partícula. Isto é, tal coordenação espalhou a radiação incidente e esse fato não se deve à molécula de Ocratoxina A isolada, haja vista ela não absorver, tampouco espalhar radiação, na região entre 350 e 800 nm do espectro uv – visível (KHOURY, E.A., *et al.*, 2010). É importante verificar que para as demais concentrações e para o sistema sem a toxina, não foi identificado o mesmo comportamento em 400 nm.

Dessa forma, uma vez que a toxina tem se mostrado responsável pelo decréscimo da intensidade de absorção em 528 nm e, agora, pelo acréscimo de absorbância em 400 nm, é possível inferir que as moléculas de ocratoxina A estão próximas o suficiente da partícula para interagir com o efeito plasmônico e aumentar o espalhamento da luz no entorno de 400 a 425nm. Na figura 5.3.6 foi realizado o mesmo teste de saturação, entretanto, foram utilizadas concentrações ainda maiores com o intuito avaliar o efeito de espalhamento. Observa-se que a extinção da luz aumenta com o aumento de OTA, de forma que a maior concentração, 75,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , produziu o maior espalhamento, um acréscimo superior a 100% na absorbância produzida pela concentração de 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de OTA. Ao colocar essas absorbâncias em um gráfico de absorbância em 400 nm em função da concentração de Ocratoxina A, confirma-se que o incremento na intensidade de extinção da luz em 400 nm é diretamente relacionado ao aumento na concentração de ocratoxina A. Fez-se, então, a estimação de uma função de regressão exponencial para os pontos experimentais, a qual melhor se ajustou aos valores observados, e, a partir dela, foi possível observar que a mudança na intensidade do pico de absorção correlaciona-se diretamente com o aumento de Ocratoxina A (Figura 5.3.7).

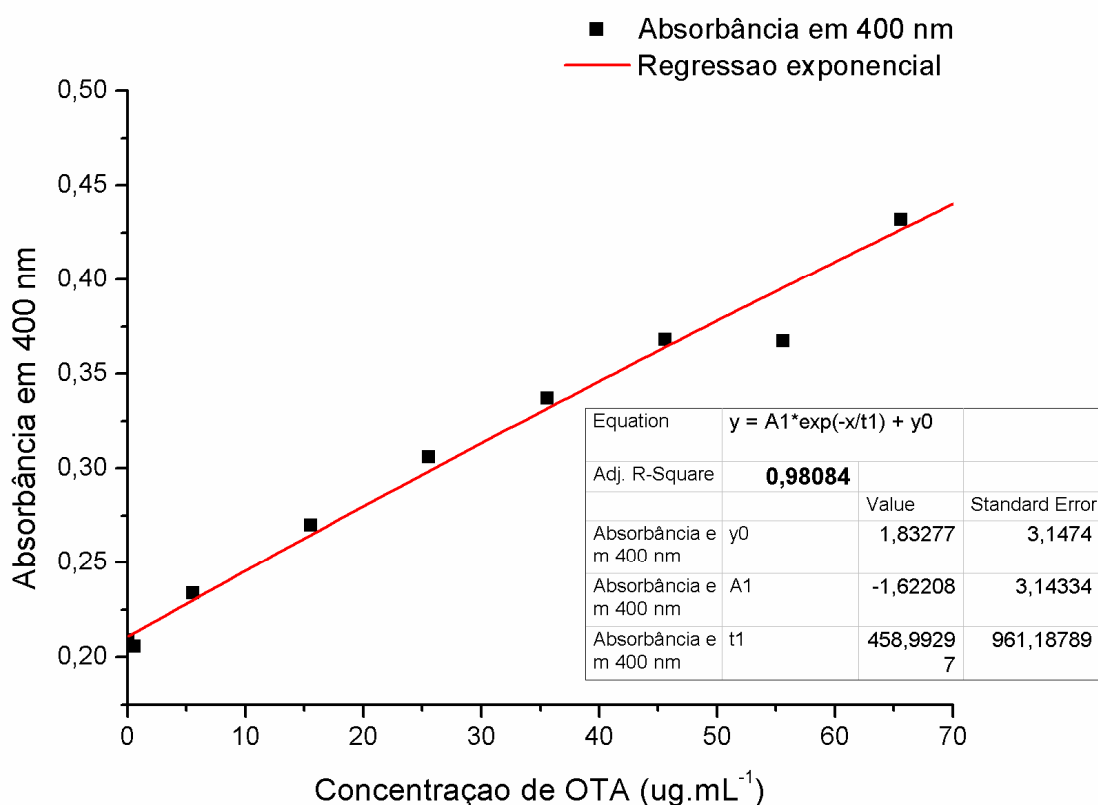


**Figura 5.3.5.** Espectros de absorção de nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato após conjugação com anticorpos Anti-Ocratoxina A, antes e após a exposição crescente de Ocratoxina A (OTA), nas concentrações de  $1 \times 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  e  $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .





**Figura 5.3.6** Espectros de absorção de nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato após conjugação com anticorpos Anti-Ocratoxina A, submetidos à exposição crescente de Ocratoxina A (OTA). As concentrações variaram entre  $1 \times 10^{-1}$  e  $75,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .



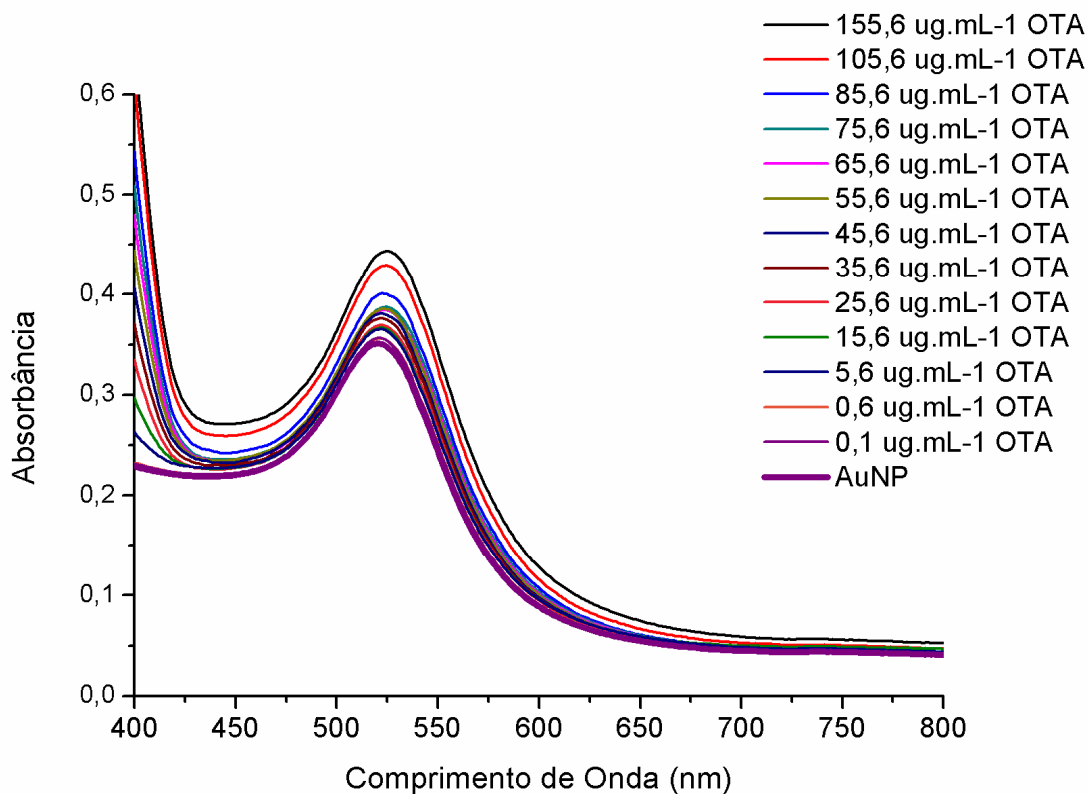
**Figura 5.3.7.** Absorbâncias em 400 nm em resposta ao aumento na concentração de ocratoxina a no meio, na ausência de anticorpos.

Após constatar que concentrações crescentes de Ocratoxina A podem, em baixas concentrações, diminuir linearmente a intensidade do pico plasmônico e, em concentrações elevadas, elevar linearmente o espalhamento em 400 nm, optou-se por testar a influência que a molécula poderia exercer sobre o colóide de nanopartículas na ausência de anticorpos Anti-Ocratoxina A. Para isso, utilizou-se o colóide de AuNPs em pH 9, sem adição de anticorpos, para testar concentrações crescentes de OTA. Os espectros obtidos demonstraram uma relação extremamente importante, inversa e intensa entre a quantidade de toxina e a absorbância (Figura 5.3.8). Neles, observa-se um aumento de intensidade de absorção em 530 nm, um leve deslocamento para a direita e um aumento da absorbância na região de 400 a 425 nm. Tal evento também pode ser explicado pelo fato de a elevação da energia incidida ser acompanhada pelo aumento da capacidade de absorção do sistema nanopartícula-toxina devido às excitações internas na estrutura química da toxina. Nesse enfoque, a nanopartícula agiria como uma antena captando a energia incidida e transferindo-a para a estrutura química (ZHU, H., 2010).

Essas mudanças indicam que na ausência de anticorpos as nanopartículas de ouro e a molécula de Ocratoxina A interagem de maneira a intensificar a percepção do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada, pois a molécula induz o aumento não somente da absorbância no pico que corresponde ao plasmônico, mas também na região de maior energia. Esse fenômeno proporciona um aumento da extinção da luz no espectro como um todo e permite-nos inferir que apesar de a interação entre a toxina e a partícula existir, ela se mostra menos estável do que a interação entre anticorpos e partículas, haja vista a toxina não deslocar o anticorpo quando este está presente no meio, fazendo com que a intensidade de absorbância diminua. Além disso, é possível presumir que mudanças no pH do meio podem induzir a substituição da interação nanopartícula-anticorpo pela interação entre a toxina e a nanopartícula ou entre a toxina e o anticorpo do meio, ou seja, a alteração do pH para valores capazes de desestabilizarem a adsorção iônica dos anticorpos é capaz de influenciar o sensor de maneira inversa. Tal fato nos permite concluir seguramente três afirmações: que os anticorpos estão adsorvidos na nanopartícula, uma vez que não se observa a interação entre a toxina e a partícula cujo efeito é inverso; que a interação entre nanopartículas e anticorpos não é desestabilizada na presença da toxina; que o anticorpo apresenta atividade em pH 9, haja vista o decréscimo na absorbância que demonstra que a molécula da toxina não está interagindo significativamente com a nanopartícula a ponto de os efeitos se anularem, além disso, sabe-se que anticorpos IgG apresentam  $\sim 14 \times 8 \times 4 \text{ nm}^3$  (MONTENEGRO, J.M. *et al.*, 2013) nanômetros de tamanho, em média, e que o seu formato em Y não permite recobrir toda a superfície de contato, indicando que a toxina tem preferência pelo anticorpo e este está ativo, caso contrário, a molécula de OTA encontraria facilmente espaços para interagir com a camada elétrica da partícula.

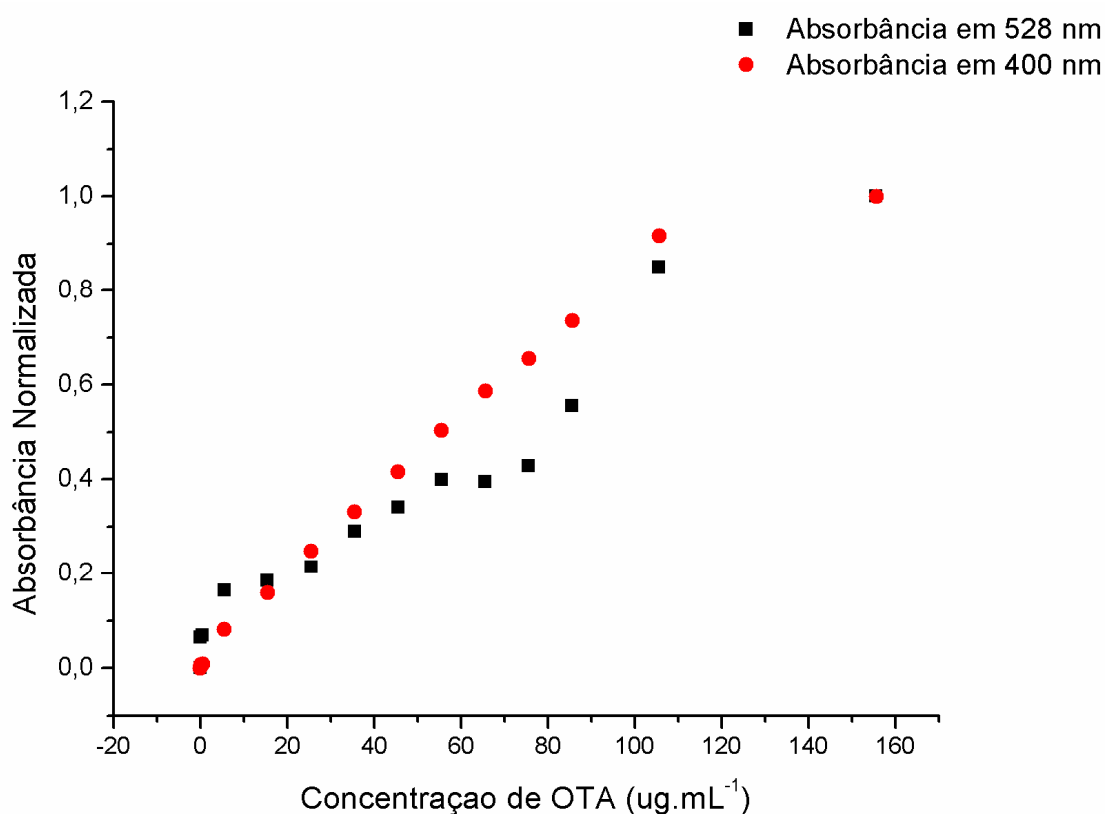
Tais achados corroboram com as teorias de adsorção iônica, as quais indicam que, por se tratar de um processo multifocal, o mecanismo da adsorção iônica depende, principalmente, do número de grupos portadores de carga presente na superfície do anticorpo. Por tanto, espera-se que os anticorpos sejam imobilizados através de locais na sua superfície nos quais há as maiores possibilidades de se encontrar os múltiplos portadores de carga. Assim, uma vez que a molécula de anticorpo é assimétrica, a região com o maior número de cargas no plano envolve as quatro subunidades do anticorpo. Essa proposição sugere que o anticorpo tenha maior possibilidade de adotar uma orientação plana, na qual, sua extensão longitudinal está adsorvida na camada iônica que reveste a partícula. Dessa forma, o sítio de reconhecimento do antígeno se acomodará próximo à superfície da partícula, mas não

participará do mecanismo de adsorção, isto é, o sítio de ligação ao epítipo permanecerá desimpedido (MONTENEGRO, J.M. *et al.*, 2013). Como salientado por Montenegro, J.N. (2013) a mudança no valor de pH do meio pode vir a remover o anticorpo, inclusive quando se faz uso de tampões específicos para execução de ensaios de atividade de anticorpos.



**Figura 5.3.8.** Espectros do colóide de AuNP antes e após adição de Ocratoxina A nas concentrações entre  $1 \times 10^{-1}$  e  $155,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , na ausência de anticorpos Anti-Ocratoxina A.

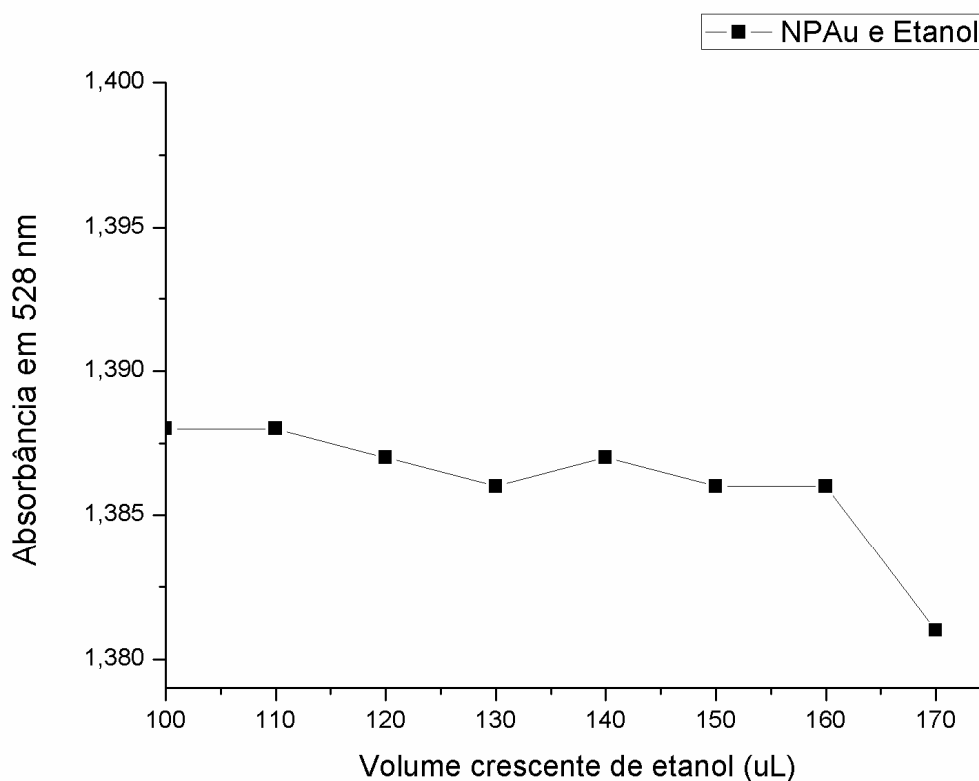
A figura 5.3.9 tem o objetivo de permitir a comparação entre os espectros da figura 5.3.8 em termos de absorvância em 400 nm e 528 nm para todas as concentrações avaliadas. Nele, é possível perceber claramente o acréscimo nos valores de absorvância em resposta ao aumento de concentração de ocratoxina A, fato este perceptível tanto para o espalhamento em 400 nm quanto para a absorvância em 528 nm.



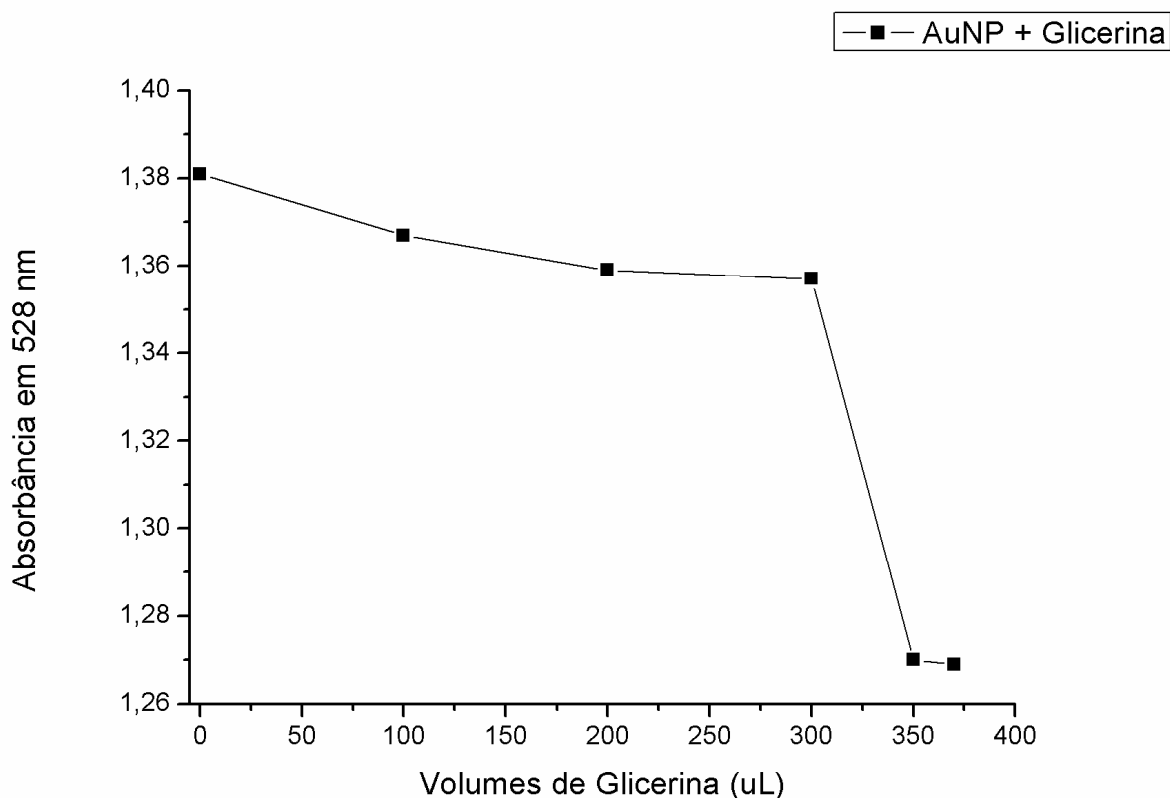
**Figura 5.3.9.** Absorbâncias nos comprimentos de onda de 400 nm e 528 nm dos espectros de absorção do colóide de nanopartículas de ouro em concentrações crescentes de ocratoxina A, na ausência de anticorpo.

CAO et al (2013) ao submeter nanoesferas e nanobastões de ouro a soluções com diferentes índices de refração observou aumento na intensidade de absorbância do pico da LSPR, bem como o referente ao espalhamento. Dessa forma, o aumento da absorbância causado pelo aumento na concentração de OTA pode estar ligado à mudança no índice de refração na região circundante à partícula em virtude da interação com a molécula de toxina. Deduz-se que a toxina esteja muito próxima à partícula, pois as concentrações testadas são demasiadamente pequenas para causar alteração no índice de refração da dispersão como um todo. Uma forma de avaliar tal suposição foi adicionar a um colóide nanopartículas concentrações crescentes de etanol (solvente utilizado para solubilizar a ocratoxina) e, em outra dispersão, concentrações crescentes de glicerina. As absorbâncias em 528 nm foram adquiridas e colocadas em dois gráficos, um em função de concentração de álcool (Figura 5.3.10) e o outro de glicerina (Figura 5.3.11). Observou-se que tanto no etanol quanto na

glicerina, os únicos efeitos percebidos foram os efeitos de diluição. Na glicerina, o volume adicionado atingiu, aproximadamente, 20% do volume total e os volumes de 5% em relação ao volume total não produziram qualquer efeito na absorbância. Em relação ao etanol, o volume adicionado alcançou aproximadamente 17 % do volume de dispersão total, o que gerou um decréscimo de apenas 3% de intensidade de absorbância. Dessa forma, é possível concluir que não foi verificada influência substancial das substâncias com índices de refração distintos para os volumes testados, volumes estes muito superiores ao teste de detecção de ocratoxina com anticorpos e inferiores ao teste de Ocratoxina A sem anticorpos. Nos testes de detecção com anticorpos as alíquotas utilizadas de Ocratoxina A foram de 1 $\mu$ L em uma dispersão de 110 $\mu$ L, totalizando 8  $\mu$ L, para as 8 concentrações testadas, ou seja, menos de 10% do volume total, produzindo uma redução de absorbância de 16%. Já o teste, no qual se utilizou Ocratoxina A sem adição de anticorpos, os volumes utilizados ultrapassaram 17% e a influência na absorbância foi inversa, ou seja, o efeito de diluição foi desprezível frente ao efeito de interação com a camada elétrica das AuNPs. Essa comparação foi importante para reforçar o efeito direto da toxina nas camadas de íons que estabilizam a nanopartícula, alterando assim o índice de refração local.



**Figura 5.3.10.** Absorbâncias em 528 nm de nanopartículas de ouro submetidas a volumes crescentes de etanol. O volume total de solução é de 1mL e o volume total adicionado foi de 170 $\mu$ L.

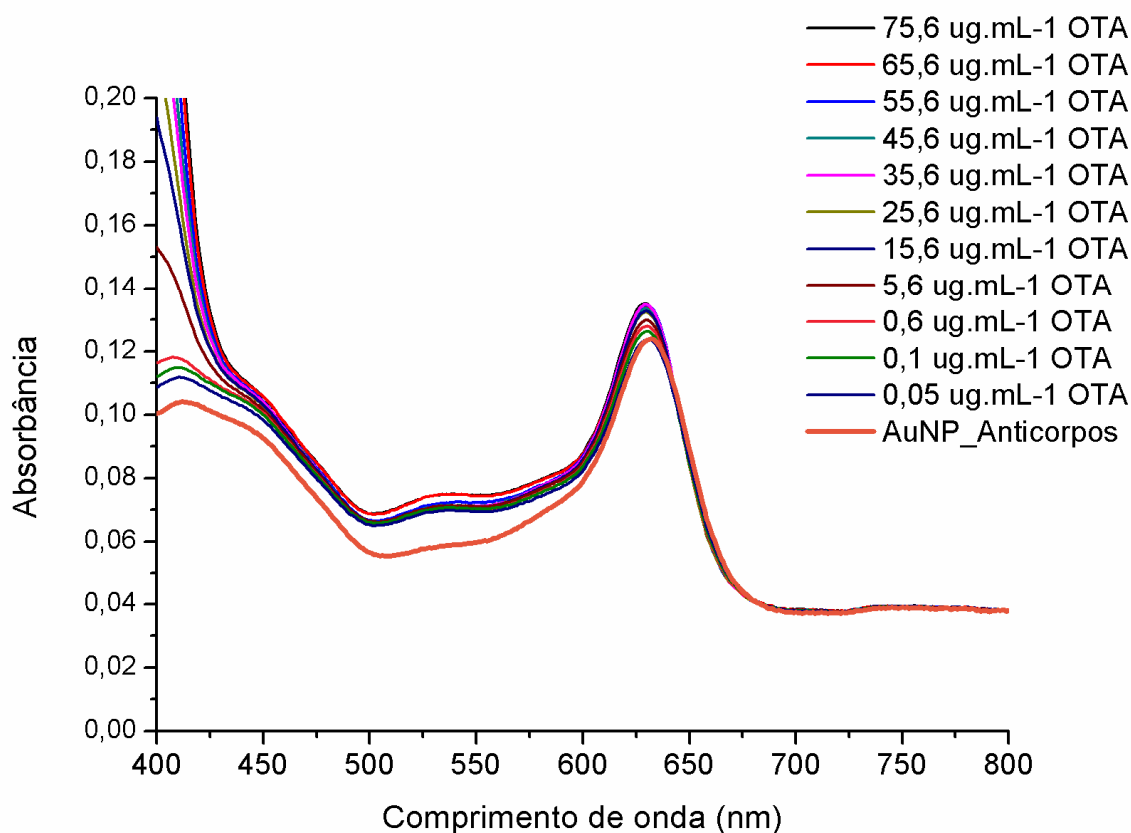


**Figura 5.3.11.** Absorbâncias em 528 nm de nanopartículas de ouro submetidas a volumes crescentes de glicerina. O volume total de solução é de 2 mL e o volume total adicionado foi de 375  $\mu$ L.

A ligação entre o antígeno e o anticorpo são sempre planejadas para um meio cujo pH seja semelhante ao fisiológico, acredita-se que nessas condições antígenos e anticorpos apresentem a melhor eficiência de interação. Entretanto, o pH 7 utilizado para a interação das AuNPs com os anticorpos mostrou pouca eficiência em estabilizar a dispersão coloidal e, por isso, foi necessário testar a viabilidade de alteração do pH. Com base nisso, planejou-se utilizar um diluente específico para anticorpos e de pH 7,4 para realizar os ensaios de detecção de OTA. O colóide de AuNPs com anticorpos foi diluído com o diluente de anticorpo nas proporções de 1:2 e 1:10. E, subsequentemente, procedeu-se com a execução do

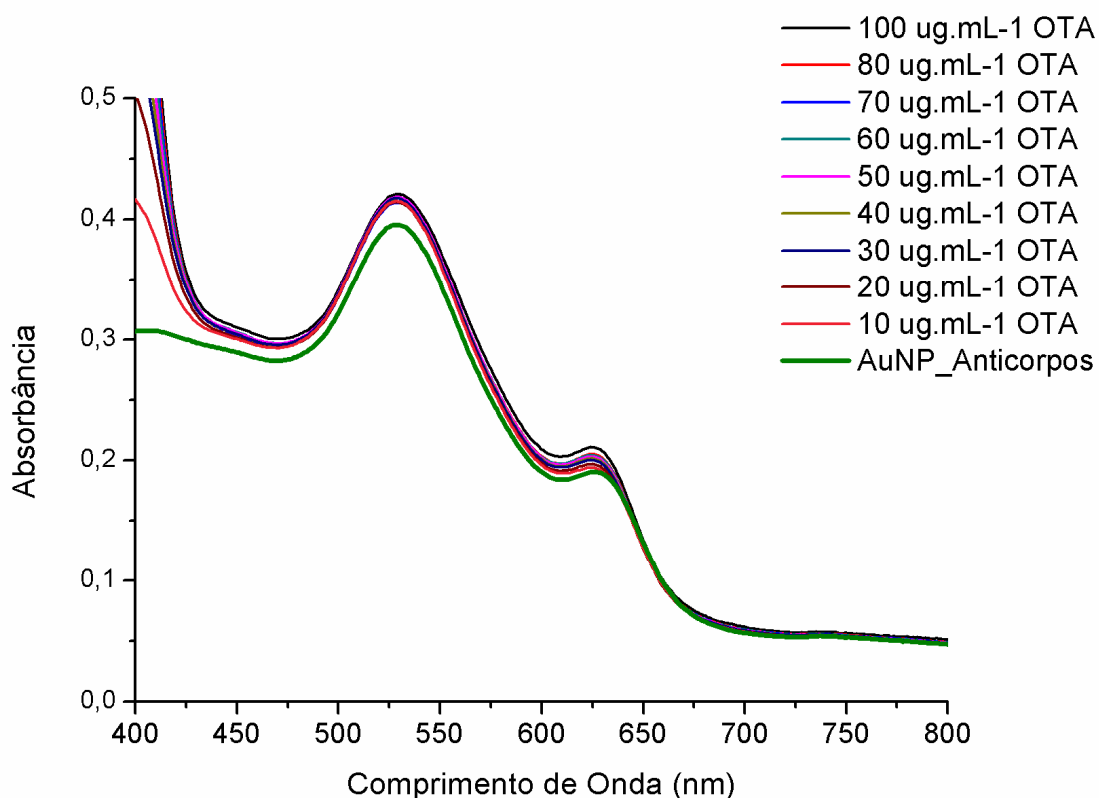
teste adicionando concentrações crescentes de OTA. Os dois gráficos, representados pelas figuras 5.3.12 e 5.3.13 demonstraram que o colóide passa a absorver em quase toda a extensão do espectro eletromagnético mensurado, destacando-se dois picos, um próximo a 530 nm e outro em 640 nm, os quais são relativos às nanopartículas e ao diluente, respectivamente. O diluente de anticorpo utilizado apresenta-se na cor verde e acabou por interferir na análise do pico. Na diluição de 1:10, o pico em 650 nanômetros mostrou-se muito intenso.

Esse ensaio permitiu observar dois efeitos, o efeito de interferência do anticorpo, haja vista sua coloração e um segundo efeito, mais importante que o primeiro, a absorbância aumentou com o aumento da concentração de Ocratoxina A, ou seja, observou-se um efeito semelhante ao detectado quando os anticorpos não estavam presentes na solução. Tal fato sugere que o pH 7.4 interferiu na adsorção iônica entre o anticorpo e a nanopartícula resultando em efeito semelhante ao observado na ausência de Anti-Ocratoxina A.





**Figura 5.3.12.** Espectros do colóide de AuNP-Ac diluído na proporção 1:10 em solução para anticorpos, antes e após adição de Ocratoxina A, abrangendo o intervalo entre  $5 \times 10^{-2}$  e  $75,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .



**Figura 5.20.** Espectros do colóide de AuNP-Ac diluído na proporção 1:2 em solução para anticorpos, antes e após adição de Ocratoxina A, abrangendo o intervalo entre 10 a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Objetivando comparar os resultados encontrados com alguns trabalhos relevantes e elucidativos, estão descritos abaixo, alguns estudos semelhantes, suas principais contribuições, salientando a similaridades ou as dessemelhanças sobre os eventos aqui descritos.

Em termos do efeito sobre a absorvância de nanopartículas em resposta ao aumento nas concentrações de proteína, outros trabalhos reportaram resultados que corroboram com os encontrados pelo presente estudo. Chakraborty *et al.* (2011), identificou que a proteína sérica bovina (BSA), quando adicionada a um colóide de nanoesferas e a outro de nanobastões, é adsorvida espontaneamente na superfície da partícula e a sua quantidade influencia diretamente na diminuição de intensidade do pico de absorvância no comprimento

de onda de 522 nm, sem alteração significativa da posição do pico no espectro. Além disso, da mesma forma que percebemos aqui, foi observado aumento na absorvância da região de 400 nm quando o BSA atingiu concentrações maiores. De maneira interessante, este estudo detectou que nanobastões se mostraram mais sensíveis ao aumento de BSA, entretanto, a adsorção não preservou a estrutura secundária e terciária da proteína. Em contrapartida, o BSA adsorvido às nanopartículas de ouro manteve suas estruturas intactas. Para isso, as técnicas de calorimetria isotérmica, dicroísmo circular, infravermelho e espectroscopia de fluorescência foram utilizadas visando determinar a perda de ligações de hidrogênio no processo de desnaturação do BSA frente à adsorção. Tal observação é muito importante para os imunoenaios, uma vez que a estrutura dos anticorpos é crucial para a sua atividade. Em outro estudo, Lin, S.H. (2014) também observou perda de intensidade de luz transmitida ao testar nanopartículas de ouro conjugadas a anticorpos em resposta ao aumento na concentração de dois vírus. Seu mecanismo baseava-se na utilização de uma fibra óptica recoberta por AuNPs conjugadas com anticorpos e um detector de luz transmitida. O princípio é semelhante ao explorado no presente estudo, no qual, conforme Lin, o coeficiente de absorção da luz pelas nanopartículas aumenta quando o índice de refração aumenta. Dessa forma, o aumento no índice de refração local na superfície da partícula, em virtude da ligação antígeno-anticorpo, pode ser revelado pelo decréscimo da intensidade da luz transmitida através da fibra óptica. As concentrações detectadas pelo estudo foram 48 e 42  $\text{pg.mL}^{-1}$  (4,8 e  $4,2 \cdot 10^{-5} \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com coeficientes de correlação de 0,9985 e 0,9895 para os dois tipos de vírus testados para uma matriz complexa.

Em termos de concentração, a menor concentração detectada pelo presente estudo é semelhante aos estudos de melhor limite de detecção encontrados, dentre eles, um estudo realizado por Jiang, L *et al.* (2014), no qual, imobilizou-se uma molécula de DNA (DNA1) com um grupamento tiol na superfície de um eletrodo de ouro através da interação Au-S. Posteriormente, imobilizou-se aptâmeros “anti-ocratoxina a” por meio de hidratação com as moléculas de DNA1, incubou-se com a toxina e, sequencialmente, adicionou AuNPs conjugadas com oxido de grafeno e moléculas DNA2 para interagir com o aptâmero imobilizado, ou seja, foi construído um mecanismo de “sanduíche” DNA1/Aptâmero/OTA/DNA2, semelhante aos realizados em ELISA, exceto pela utilização de aptâmeros e não de anticorpos, no qual as nanopartículas de ouro ao serem conectadas ao eletrodo alteram a passagem de corrente, amplificando o sinal quando o sistema é submetido a uma tensão. A menor concentração detectada foi de  $3 \cdot 10^{-7} \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Park, J.H. (2014) detectou

concentrações de 1nM de OTA ( $10^{-6} \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) utilizando aptâmeros (ácidos nucleicos delineados para interagirem especificamente com as substâncias-alvo) conectados a nanobastões. Em seu trabalho, a resposta à interação aptâmero-OTA foi percebida na forma de mudança do comprimento de onda de absorção máxima da região de 700 nm. Segundo Park, o desvio para a direita do pico parece estar relacionado à mudança no índice de refração no entorno da partícula, provocado pela mudança de conformação do aptâmero que forma uma estrutura quádrupla ao se ligar com a OTA. A maior concentração de OTA,  $10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$ , resultou em um deslocamento de pico de 3,6 nm, enquanto a menor concentração resultou na mudança de apenas 1 nm, cujo coeficiente de correlação relativa foi de 0,9732, ou seja, resultados interessantes, porém menos expressivos do que os nossos tanto em confiança quanto em sensibilidade. Entretanto, a maior contribuição do trabalho para a ciência consistiu na capacidade regenerativa dos aptâmeros, conferindo ao sensor citado reversibilidade da conformação quádrupla adquirida pelo aptâmero após a conjugação com o analito, permitindo, assim, o reuso. Fato este que deve vir a ser uma das perspectivas do presente estudo.

## 6 CONCLUSÕES

A partir de todo o trabalho realizado foi possível obter conclusões importantes acerca do comportamento do colóide através das etapas de caracterização, durante os testes de estabilidade em resposta à adição de eletrólitos e à mudança de pH, sobre a possibilidade de detecção de concentrações diminutas, da interação das nanopartículas com os anticorpos a toxina, sobre as restrições e interferências às quais o teste se submete e na investigação dos efeitos descritos.

Dessa forma, em virtude do montante de informações optou-se por elencar aqui apenas aqueles imprescindíveis para predizer a potencialidade do uso do sistema no desenvolvimento de dispositivos de detecção. Assim, observou-se o que a conjugação de anticorpos Anti-Ocratoxina A ocorre de maneira espontânea, provavelmente, por adsorção iônica e sem deslocar a primeira esfera de coordenação do citrato, haja vista vários fatores, tais quais: i) A pequena alteração nas bandas de espalhamento das carboxilas observada no espectro Raman após a adição do anticorpo; ii) o deslocamento do pico de absorção do espectro eletromagnético Uv-Visível na presença de anticorpo; iii) a diminuição da intensidade da absorbância quando este é adicionado; iv) a ausência de interferência causada pela molécula de ocratoxina quando os anticorpos estão presentes; v) a diminuição da eficiência do sistema de detecção quando o número de moléculas de Ocratoxina A atinge o nível de saturação do sistema, fato este que coincide com o montante de anticorpos da dispersão; e, por último, vi) o retorno de interferência causado pela Ocratoxina A quando o pH do meio é alterado.

Outra observação recai sobre a interação das nanopartículas com a molécula de ocratoxina, a qual tem influência sobre a intensidade do pico plasmônico, causando um acréscimo substancial de absorbância quando os anticorpos estão ausentes, tal interação foi importante para elucidar que apesar de haver a possibilidade de interação entre a molécula e o elemento sensor, os anticorpos apresentaram maior estabilidade na adsorção à superfície metálica e esta preservou o sítio de ligação. A técnica se mostrou sensível à mudança de pH do meio, exigindo a manutenção do pH próximo ao ideal determinado pelo teste do *Gold Number*.

Por fim, o mecanismo proposto foi capaz de detectar perturbações no sistema, com concentrações de Ocratoxina A com concentrações de  $1.10^{-7} \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Por tanto, cabe ressaltar aqui que os resultados dos ensaios apresentaram boa correlação com os princípios teóricos e comparáveis aos melhores resultados encontrados na bibliografia, mesmo que em fase

preliminar, sugerindo grande potencialidade de aplicação. Não menos importante do que o potencial de aplicação, a compreensão de muitos eventos foi extremamente satisfatória para o delineamento de novos experimentos, para evitar futuros erros e contribuir para o desenvolvimento do tema. Como em toda investigação, surgiram novas perguntas imprescindíveis para avançarmos, tal qual o comportamento da carga eletrocinética em resposta à mudança de pH das partículas.

Conclui-se, ainda, que nos últimos anos, uma série de sensores vem sendo elaborados e algumas revisões já foram publicadas, contudo, muitos aspectos não são completamente elucidados. A percepção que o montante de artigos transpassa remete majoritariamente à ciência aplicada e apenas exceções se atêm à ciência básica, tal qual o estudo aprofundado dos efeitos e das interferências. Obviamente, não se espera de uma área recente e complexa a compreensão completa, mas a interpretação dos fatos e não tão somente a aplicação imediata parece precária em relação a outras áreas. Por isso, alguns dos efeitos aqui encontrados não puderam ser completamente compreendidos. Contudo, muitas questões importantes foram comprovadas.

Ainda que o presente estudo tenha também um objetivo aplicado, as conclusões extraídas desses ensaios foram elucidativas e importantes para que a aplicação do princípio seja transferido para um dispositivo portátil. Tendo em vista o grande impacto que a Ocratoxina A pode causar na saúde e na economia e, paradoxalmente, a baixa divulgação e conscientização do problema para a sociedade torna imprescindível a continuidade do estudo, paralela ao desenvolvimento do dispositivo.

## 7 REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, Sagar M. et al. Electrophoretic mobility of colloidal gold particles in electrolyte solutions. **Langmuir**, v. 25, n. 8, p. 4804-4807, 2009.
- ANKER, Jeffrey N. et al. Biosensing with plasmonicnanosensors. **Nature materials**, v. 7, n. 6, p. 442-453, 2008.
- ALMEIDA, Adriana P. de et al. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 300-303, 2007.
- AMIT, A.; MARIUZZA, R.; PHILLIPS, S.; POLJAK, R. 3-Dimensional structure of an antigen–antibody complex at 2.8-Å resolution, **Science** 233 747–753 (1986).
- APPELL, David. Nanotechnology: wired for success. **Nature**, v. 419, n. 6907, p. 553-555, 2002
- BALACHANDRAN, V. et al. Theoretical investigations on the molecular structure, vibrational spectra, thermodynamics, HOMO–LUMO, NBO analyses and paramagnetic susceptibility properties of p-(p-hydroxyphenoxy) benzoic acid. **SpectrochimicaActa Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 121, p. 575-585, 2014.
- BARMPARIS, Georgios D. et al. Nanoparticle shapes by using Wulff constructions and first-principles calculations. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 361-368, 2015.
- BARMPARIS, Georgios D.; REMEDIAKIS, Ioannis N. First-principles atomistic Wulff constructions for gold nanoparticles. **arXiv preprint arXiv:1111.4667**, 2011.
- BERTOLI, Alexandre C. et al. Theoretical spectroscopic studies and identification of metal-citrate (Cd and Pb) complexes by ESI-MS in aqueous solution. **SpectrochimicaActa Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 271-280, 2015.
- BINDER, E. M., TAM, L. M., CHIN, L.J., HANDL, J., RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, 137: 265–282, 2007.
- BRIGGER, Irène; DUBERNET, Catherine; COUVREUR, Patrick. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 24-36, 2012.
- BROWN, Kenneth R.; WALTER, Daniel G.; NATAN, Michael J. Seeding of colloidal Au nanoparticle solutions. 2. Improved control of particle size and shape. **Chemistry of Materials**, v. 12, n. 2, p. 306-313, 2000.
- BUSSERON, Eric et al. Supramolecular self-assemblies as functional nanomaterials. **Nanoscale**, v. 5, n. 16, p. 7098-7140, 2013.

CAO, Jie et al. Wavelength-based localized surface plasmon resonance optical fiber biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 181, p. 611-619, 2013.

CHAKRABORTY, Soumyananda et al. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir*, v. 27, n. 12, p. 7722-7731, 2011.

CHEN, Kai et al. Moiré Nanosphere Lithography. *ACS nano*, v. 9, n. 6, p. 6031-6040, 2015.

CHENG, S.F., CHAU, L.K. Colloidal Gold-Modified Optical Fiber for Chemical and Biochemical Sensing. *Analytical Chemistry* (2003) 75, 16-21.

CHIRICO, Giuseppe; BORZENKOV, Mykola; PALLAVICINI, Piersandro. Gold Nanostars: Synthesis, Properties and Biomedical Application. *Springer*, 2015.

HOLISTER, Paul; VAS, Cristina Román; HARPER, Tim. Bottom-up Production Techniques. *Technology White Papers*, n. 15, 2003.

CREIGHTON, J. Alan; EADON, Desmond G. Ultraviolet–visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, v. 87, n. 24, p. 3881-3891, 1991.

DUARTE, S.C.; LINO, C.M.; PENA, A. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: A review of the worldwide status. *Food Additives Contaminants*. A 27, 1440–1450. 2010.

ECHER, Ezequiel; SOUZA, M. P.; SCHUCH, N. J. The beer's law applied to the earth's atmosphere. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 23, n. 3, p. 276-283, 2001.

EDWARDS, Steven A. **The nanotech pioneers: where are they taking us**. John Wiley & Sons, 2008.

EL KHOURY, André; ATOUI, Ali. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins*, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non-dioxin-like PCBs and melamine in foods. *Off. J. Eur. Union*, v. 176, p. L43-L45, 2012.

EUSTIS, Susie; EL-SAYED, Mostafa A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*, v. 35, n. 3, p. 209-217, 2006.

FARADAY, Michael. “The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* n.147, p.145–181, 1857.

FEYNMAN, Richard P. There's plenty of room at the bottom. Miniaturization"(HD Gilbert, ed.) Reinhold, New York, 1961.

FLEISCHMANN, Martin; HENDRA, Patrick J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163-166, 1974.

HA, Tai Hwan. Recent Advances for the Detection of Ochratoxin A. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5276-5300, 2015.

HAISS, Wolfgang et al. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215-4221, 2007.

HÄKKINEN, H. The gold–sulfur interface at the nanoscale. **Nature Chemistry** (2012) 4, 443-455.

HAYAT, A., YANG, C., RHOUATI, A., MARTY, J. L. Recent Advances and Achievements in Nanomaterial-Based, and Structure Switchable Aptasensing Platforms for Ochratoxin A Detection. **Sensors**. v.13, p.15187-15208, 2013.

HAYNES, Christy L.; VAN DUYN, Richard P. Nanosphere lithography: a versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 24, p. 5599-5611, 2001.

HEO, Kyong Chan; GWAG, JinSeog. Shape-modification of patterned nanoparticles by an ion beam treatment. **Nature - Scientific reports**, v. 5, 2015.

HIEMENZ, Paul C. et al. **Principles of colloid and surface chemistry**. New York: M. Dekker, 1986.

Huang, C., Bonroy, K., Reekman, G., Verstreken, K., Lagae, L., Borghs, G. An On-Chip Localized Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor for label-free Monitoring of Antigen-Antibody Reaction. **Microelectronic Engineering** (2009) 86, 2437-2441.

JANEWAY, Charles A.; TRAVERS, Paul; WALPORT, Mark. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. New York: Garland, 2005

JI, Xiaohui et al. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 45, p. 13939-13948, 2007.

JIANG, Ling et al. Amplified impedimetric aptasensor based on gold nanoparticles covalently bound graphene sheet for the picomolar detection of ochratoxin A. **Analytica chimica acta**, v. 806, p. 128-135, 2014.

KHAWLI, L. A., GOSWAMI, S., HUTCHINSON, R., KWONG, Z. W., YANG, J., WANG, X.; NIJEM, I. Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. **InMAbs** , v. 2, n. 6, p. 613-624, 2010.



- KEDEM, Ofer et al. Oscillatory behavior of the long-range response of localized surface plasmon resonance transducers. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 51, p. 26865-26873, 2012.
- LASERNA, J. J. Combining fingerprinting capability with trace analytical detection: surface-enhanced Raman spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 283, n. 1, p. 607-622, 1993.
- LASERNA, J. J. Combining fingerprinting capability with trace analytical detection: surface-enhanced Raman spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 283, n. 1, p. 607-622, 1993.
- LIN, Hsing-Ying et al. Direct detection of orchid viruses using nanorod-based fiber optic particle plasmon resonance immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 51, p. 371-378, 2014.
- LU, Wei; LIEBER, Charles M. Nanoelectronics from the bottom up. **Nature materials**, v. 6, n. 11, p. 841-850, 2007.
- LUO, Mingxiang; OLIVIER, Gloria K.; FRECHETTE, Joelle. Electrostatic interactions to modulate the reflective assembly of nanoparticles at the oil–water interface. **Soft Matter**, v. 8, n. 47, p. 11923-11932, 2012.
- MARIN, S., RAMOS, A. J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, n.60, 218–237, 2013.
- MCNAY, Graeme et al. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS): a review of applications. **Applied spectroscopy**, v. 65, n. 8, p. 825-837, 2011.
- MEHTALA, Jonathan G. et al. Citrate-stabilized gold nanorods. **Langmuir**, v. 30, n. 46, p. 13727-13730, 2014.
- MIJATOVIC, D.; EIJKEL, J. C. T.; VAN DEN BERG, A. Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up—a review. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 5, p. 492-500, 2005.
- MONTENEGRO, Jose-Maria et al. Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 5, p. 677-688, 2013.
- MOORES, Audrey; GOETTMANN, Frederic. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. **New Journal of Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1121-1132, 2006.
- MOSKOVITS, Martin. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 6-7, p. 485-496, 2005.
- MUNRO, C. H. et al. Characterization of the surface of a citrate-reduced colloid optimized for use as a substrate for surface-enhanced resonance Raman scattering. **Langmuir**, v. 11, n. 10, p. 3712-3720, 1995.

MYHRA, Sverre; RIVIÈRE, John C. **Characterization of Nanostructures**. CRC Press, 2012.

NAKANISHI, T., TAKADA, H., HIRONORI, L., KAJIURA, M., OSAKA, T. Immobilization of Nanoparticles on Optical Waveguides with Organosilane Monolayer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering** (2008) 313-314, 234-238.

NARSAIAH, K., Jha, S.N., BHARDWAJ, R., SHARMA, R., KUMAR, R. Optical biosensors for food quality and safety assurance – a review. **Journal Food Scientific Technology**, 49-383, 2012.

NEHL, Colleen L.; LIAO, Hongwei; HAFNER, Jason H. Optical properties of star-shaped gold nanoparticles. **Nano letters**, v. 6, n. 4, p. 683-688, 2006.

NUGROHO, Ferry AA et al. Bottom-Up Nanofabrication of Supported Noble Metal Alloy Nanoparticle Arrays for Plasmonics. **ACS nano**, 2016.

O'BRIEN, Evelyn; DIETRICH, Daniel R. Ochratoxin A: the continuing enigma. **Critical reviews in toxicology**, v. 35, n. 1, p. 33-60, 2005.

ONU. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics. FAO statistical year book. **World food and agriculture**. Disponível em: [http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/en/#.U56\\_nXJdVFV](http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/en/#.U56_nXJdVFV), acessada em Junho 2014.

OSTRY, V.; MALIR, F.; DOFKOVA, M.; SKARKOVA, J.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; RUPRICH, J. Ochratoxin A dietary exposure of ten population groups in the Czech Republic: Comparison with data over the world. **Toxins** v.7, p.3608–3635, 2015.

PARK, Jin-Ho et al. A regeneratable, label-free, localized surface plasmon resonance (LSPR) aptasensor for the detection of ochratoxin A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, p. 321-327, 2014.

PETRYAYEVA, Eleonora; KRULL, Ulrich J. Localized surface plasmon resonance: nanostructures, bioassays and biosensing—a review. **Analytica chimica acta**, v. 706, n. 1, p. 8-24, 2011.

PIMPIN, Alongkorn; SRITURAVANICH, Werayut. Review on micro-and nanolithography techniques and their applications. **Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 37-56, 2011.

POLTE, Jörg et al. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 4, p. 1296-1301, 2010.

PRASAD, Paras N. Nanophotonics. **Nanophotonics, by Paras N. Prasad**, p. 432. ISBN 0-471-64988-0. Wiley-VCH, v. 1, 2004.

QUINTEN, Michael. Optical properties of nanoparticle systems: Mie and beyond. John Wiley & Sons, p. 70, 2010.

- RANGEL, Renato N. **Colóides: um estudo introdutório**. LCTE Editora: São Paulo, 2006.
- REIMER, Ludwig. Transmission electron microscopy: physics of image formation and microanalysis. **Springer**, 2013.
- RIOUX, David; MEUNIER, Michel. Seeded Growth Synthesis of Composition and Size-Controlled Gold–Silver Alloy Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 23, p. 13160-13168, 2015.
- RONKAINEN, Niina J.; HALSALL, H. Brian; HEINEMAN, William R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.
- SANDHU, Adarsh. Who invented nano?. **Nature Nanotechnology**, v. 1, n. 2, p. 87-87, 2006.
- SCARPETTINI, A.F. e BRAGAS, A.V. Coverage and Aggregation of Gold Nanoparticles on Silanized Glasses. **Langmuir** (2010) 26, 15948–15953.
- SCHOLL, Jonathan A.; KOH, Ai Leen; DIONNE, Jennifer A. Quantum plasmon resonances of individual metallic nanoparticles. **Nature**, v. 483, n. 7390, p. 421-427, 2012.
- SEPÚLVEDA, Borja et al. LSPR-based nanobiosensors. **Nano Today**, v. 4, n. 3, p. 244-251, 2009.
- SERTOVA, NadejdaMilanova. Application of nanotechnology in detection of mycotoxins and in agricultural sector. **Journal of Central European Agriculture**, v. 16, n. 2, 2015.
- SHENHAR, Roy; ROTELLO, Vincent M. Nanoparticles: scaffolds and building blocks. **Accounts of chemical research**, v. 36, n. 7, p. 549-561, 2003.
- SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. In: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Ltc, 2007.
- SIN, Mandy LY et al. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 14, n. 2, p. 225-244, 2014.
- STELICK, Scott J.; ALGER, William H.; LAUFER, Jesse S.; WALDRON, Anna M.; BATT, Carl A. Hands-on classroom photolithography laboratory module to explore nanotechnology. **Journal of chemical education**, v. 82, n. 9, p. 1361, 2005.
- TENNYNSON, L. DOANE, Chi-Hung Chuang, REGHAN, J. Hill, e CLEMENS, Burda. Nanoparticle  $\zeta$ -Potentials. **Accounts of Chemical Research**, v.3, n.45, p.317-326, 2012.
- THEIS, Thomas et al. nano· tech· nolo· gy n. **Nature nanotechnology**, v. 1, p. 8-10, 2006.
- TOBEL, J. S. V., Repeated exposure to Ochratoxin A generates a neuroinflammatory response, characterized by neurodegenerative M1 microglial phenotype. **NeuroToxicology**. 1682: 1–10, 2014.

TOKONAMI, Shiho; SHIIGI, Hiroshi; NAGAOKA, Tsutomu. Review: micro-and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications. **Analytica chimica acta**, v. 641, n. 1, p. 7-13, 2009.

TOMA, Henrique E. O mundo nanométrico: a dimensão do novo século. **Oficina de textos**, 2009.

TOMA, Henrique E. The coordination chemistry at gold nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1158-1176, 2010.

TURKEVICH, John; STEVENSON, Peter Cooper; HILLIER, James. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.

TURNER, N. W., SUBRAHMANIAM, S., PILETSKY, S. A., Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**. 632. 168–180, 2009.

UEKANE, T. M., BANDEIRA, R. D. C. C., SILVA, M. C. comparação de métodos de análise para ocratoxina a no café: uma revisão. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**. 2010. Volume 2, nº1 /2.

VAN-VLACK, L. H. **Princípios de Ciência dos Materiais**. Editora Afiliada, 13ª edição, 2000.

VERNON-PARRY, K. D. Scanning electron microscopy: an introduction. **III-Vs Review**, v. 13, n. 4, p. 40-44, 2000.

VON TOBEL, Jenny Sandström et al. Repeated exposure to Ochratoxin A generates a neuroinflammatory response, characterized by neurodegenerative M1 microglial phenotype. **Neurotoxicology**, v. 44, p. 61-70, 2014.

WALKER, Jearl. Fundamentos de Física Vol. 2, p. 221. ISBN 978-85-216-1606-1. **LTC [S.l.].v. 2, 2009**.

WALKER, Jearl; HALLIDAY, David; RESNICK, Robert. **Fundamentos de física: Vol. 4**. LTC, vol.4, cap 42, 6 ed., 2009.

WALLRAFF, G. M.; HINSBERG, W. D. Lithographic imaging techniques for the formation of nanoscopic features. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 7, p. 1801-1822, 1999.

WEDLER, Gerd; INOCÊNCIO, A. Armando; INOCÊNCIO, Maria Alice. **Manual de química física**. 2001.

WILLETS, Katherine A.; VAN DUYNE, Richard P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v. 58, p. 267-297, 2007.

WOOF, Jenny M.; KERR, Michael A. IgA function–variations on a theme. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 175-177, 2004.

WU, Felicia; GROOPMAN, John D.; PESTKA, James J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. **Annual review of food science and technology**, v. 5, p. 351-372, 2014.

WUTHSCHICK, Maria et al. Turkevich in new robes: key questions answered for the most common gold nanoparticle synthesis. **ACS nano**, v. 9, n. 7, p. 7052-7071, 2015.

XIA, Younan et al. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 1, p. 60-103, 2009.

YE, J.; BONROY, K.; NELIS, D.; FREDERIX, F.; D'HAEN, J.; MAES, G.; BORGHS, G. Enhanced Localized Surface Plasmon Resonance Sensing on Three-Dimensional Gold Nanoparticles Assemblies. Colloids and Surfaces A. **Physicochemical Engineering**. N.321, p.313-317, 2008.

YAN, Jiahao et al. New type high-index dielectric nanosensors based on the scattering intensity shift. **Nanoscale**, 2016.

YOU, Hongjun et al. Synthesis of colloidal metal and metal alloy nanoparticles for electrochemical energy applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 7, p. 2880-2904, 2013.

YOUNG, Hugh D; FREEDMAN, Roger A. **Física III, IV** – Sears e Zemansky, 12ª edição. São Paulo: Addison Wesley, 2003.

ZHANG, Q., XUE, C., YUAN, Y., LEE, J., SUN, D., XIONG, J. Fiber Surface Modification Technology for Fiber-Optic Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors. **Sensors**. 2729-2741, 2012.

ZHU, Huaiyong et al. Reduction of nitroaromatic compounds on supported gold nanoparticles by visible and ultraviolet light. *Angewandte Chemie*, v. 122, n. 50, p. 9851-9855, 2010.